CHIKUNGUNYA EM RORAIMA:

Características moleculares e perfil clínico do vírus isolado no estado no ano de 2015

AURENICE DOS REIS ROCHA RODRIGUES

Atena
Editora
Ano 2023

CHIKUNGUNYA EM RORAIMA:

Características moleculares e perfil clínico do vírus isolado no estado no ano de 2015

AURENICE DOS REIS ROCHA RODRIGUES

Atena Editora
Ano 2023

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Chikungunya em Roraima: características moleculares e perfil clínico do vírus isolado no estado no ano de 2015

Diagramação: Letícia Alves Vitral
Correção: Flávia Roberta Barão
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: A autora
Autora: Aurenice dos Reis Rocha Rodrigues

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R696 Rodrigues, Aurenice dos Reis Rocha
Chikungunya em Roraima: características moleculares e perfil clínico do vírus isolado no estado no ano de 2015 / Aurenice dos Reis Rocha Rodrigues. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-1020-1
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.201231702

1. Chikungunya. I. Rodrigues, Aurenice dos Reis Rocha. II. Título.

CDD 616.91

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DA AUTORA

A autora desta obra: 1. Atesta não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declara que participou ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certifica que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirma a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhece ter informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autoriza a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

A Deus e minha querida família representada pelo meu amado marido José Rodrigues e ao meu lindo e amado filho Arthur Rodrigues.

AGRADECIMENTOS

A Deus sempre em primeiro lugar, pois sem Ele não seria possível nada em minha vida, pois é Quem tem me fornecido forças física e mental quando parecia esmorecer.

Ao meu amado marido, que com paciência e dedicação me apoia em todas as minhas escolhas e se orgulha de minhas conquistas.

Ao meu lindo e amado filho, que juntamente comigo sentiu todas as emoções desde o ventre e ainda em muitos momentos a falta de atenção de sua mãe.

Ao meu querido professor e orientador Pablo, que com sua dedicação e amor pela ciência me inseriu no mundo da Biologia Molecular e mesmo em momentos de dificuldades não me abandonou, sempre estando presente me apoiando, incentivando, aconselhando e me podando. Tenho certeza que não poderia ter escolhido melhor orientador, pois em toda minha vida acadêmica nunca encontrei professor mais dedicado aos seus alunos de modo geral.

À equipe do LabMol-CBio- UFRR e ao alunos do Professor Pablo que me apoiaram e me ajudaram incondicionalmente com os experimentos no laboratório mesmo em finais de semana e feriados, grata à Enayra, Kemeson, Mayara Bianca e Ismael Alexandre, que com sua inteligência e humildade procura ajudar a todos seus colegas e para mim foi um apoio inigualável e também à professora Fabiana Granja, que foi a primeira pessoa a me apresentar o incrível mundo da Biologia molecular com suas agradabilíssimas aulas.

Ao CpLMD- FIOCRUZ-AM, na pessoa do Professor Dr. Felipe Naveca que permitiu o sequenciamento, cedendo um de seus dedicados alunos, Victor Souza, que compartilhou comigo um pouco de seu tempo e conhecimento com muita dedicação e paciência.

E por fim ao Hospital Geral de Roraima e Lacen/RR pela parceria que proporcionou a disponibilidade de amostras para o estudo, e CGVS, na pessoa de Ana Paula Guth da Vigilância Epidemiológica que nunca colocou dificuldades para disponibilidade de informações requeridas.

A todos, meu sincero agradecimento.

RESUMO

O CHIKV é um *arbovírus* emergente, membro do gênero *Alphavírus* e da família *Togaviridae*, tendo como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti* e como vetor secundário o *Aedes albopictus*. Desde 2005, circulam simultaneamente e causando epidemias os genótipos: África Ocidental- WA, África Central Sul e Leste – ECSA, Asiático e IOL. O CHIKV é uma pequena partícula esférica medindo cerca de 60 - 70 nm de diâmetro. Possui Ácido Ribonucleico como material genético, constituído de uma única cadeia de RNA de sentido positivo, protegido por um envoltório proteico icosaédrico chamado de capsídeo. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular e determinar o perfil clínico do arbovírus CHIKV circulante no estado de Roraima no ano de 2015. As amostras de soro suspeitas de CHIKV foram submetidas à extração do RNA genômico. Para identificação viral uma qRT-PCR foi usada. Para obtenção de um fragmento de 434pb da região da proteína não estrutural nsp1 do genoma viral foi realizado a RT-PCR convencional usando iniciadores específicos. Os produtos de PCR gerados foram sequenciados, analisados e editados a fim de obter uma sequência consenso. Para análise molecular, as três sequências obtidas foram comparadas com cepas representativas dos quatro genótipos existentes depositadas no banco de dados do GenBank. A árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor-Joinning. As cepas isoladas no estudo se agruparam junto ao genótipo Asiático, formando um subclado com as cepas americanas. As amostras do estudo apresentaram uma similaridade de 99,4% - 100% com as cepas Asiáticas extraídas do GenBank. Foram encontradas três substituições de nucleotídeos por transição na posição 333 C→T, 351 C→T e 369 G→A, além de uma única substituição por transversão na posição 340 sendo de A→T em uma única amostra (15/116RR), que resultou em trocas de aminoácidos residuais T118S (Thr → Ser) com caracteristicas bioquimicamente semelhantes. Esses dados indicam que as cepas de CHIKV isolados em Roraima apresentam aminoácidos altamente conservados. Dentre as características clínicas, os sintomas mais frequentes identificados no estudo foram febre (100%), cefaleia (95,7%), artralgia (73,9%) e mialgia (65,2%). A artralgia se localizou principalmente nas pequenas articulações dos membros inferiores e superiores, que retornou acontecer em 33,3% dos pacientes em cerca de 45 dias após a fase aguda da doença. Os resultados indicam a presença do genótipo Asiático circulando no estado de Roraima e demonstram características clínicas semelhantes ao relatado em literatura.

Palavras chave: Chikungunya, Roraima, RT-PCR

ABSTRACT

The CHIKV is a member of the genus emerging arbovirus alphavirus and the Togaviridae family, having main vector Aedes aegypti and as secondary vector Aedes albopictus the. Since 2005, simultaneously circulating and causing epidemics genotypes: WA West Africa, South East and Central Africa - ECSA, Asia and IOL. The CHIKV is a small spherical particle measuring approximately 60-70 nm in diameter. Has Ribonucleic Acid as genetic material consisting of a single RNA chain of positive sense, protected by an icosahedral protein called a capsid. The entetion of this study was to characterize molecular and clinical profile of current CHIKV arboviruses in the state of Roraima in 2015. Samples of suspected CHIKV serum were extracted genomic RNA using the QIAamp kit following the protocol instructions manufacturer. It was used for identification of viruses one qRT-PCR. To obtain a fragment of 434pb of nsp1 nonstructural protein region was conducted the RT-PCR conventional wsing of the viral genome-specific primers. The PCR products generated were sequenced, analyzed and edited to obtain a consensus sequence using Geneious v program. 9.0.2. For molecular analysis, the three sequences obtained were compared with representative strains of the four existing genotypes deposited in the GenBank database worldwide. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joinning method. All isolates of Roraima gathered in the Asian genotype forming a subclade with the American strains. Study samples showed a similarity of 99.4% - 100% with the extracted Asian strains from GenBank. Three transitional by nucleotide substitutions were found at position 333 C → T 351 C → T and 369 G → A, and a single substitution transversion at position 340 and A → T in one sample (15 / 116RR), which resulted in residual T118S amino acid exchanges (Thr → Ser) with similar biochemical characteristics. These data indicate that the strains isolated CHIKV in Roraima have highly conserved amino acids. Among the clinical characteristics the most frequent symptoms identified in the study were fever (100%), headache (95.7%), arthralgia (73.9%) and myalgia (65.2%). Arthralgia was located mainly in the small joints of the lower and upper limbs, which returned to happen in 3 patients (33.3%) in about 45 days after the acute phase of the disease. The results indicate the presence of Asian genotype in the State of Roraima and demostrate clinical features similar to that reported in the literature.

Keywords: Chikungunya, Roraima, RT-PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica de Chikungunya nas Américas- Semana 49 de 2013- semana 45 de 2015 22
Figura 2 - Distribuição de casos importados e autóctones de febre chikungunya, Brasil, 2014 e 2015 25
Figura 3 - Estrutura morfológica do CHIKV 28
Figura 4 - Organização do genoma do CHIKV 29
Figura 5 - Sintomatologia Geral da infecção por chikungunya 33
Figura 6 - Principal vetor do vírus Chikungunya- mosquito Aedes aegypti 37
Figura 7 - Os ciclos de Transmissão do CHIKV 41
Figura 8 - Período de incubação Intrínseco e Extrínseco do CHIKV. 42
Figura 9 - Etapas da PCR 45
Figura 10 - Representação de eletroforese em gel 48
Figura 11 - PCR em Tempo Real com SYB Green® 50
Figura 12 - PCR em Tempo Real com sonda TaqMan® 50
Figura 13 - Curva de amplificação da PCR em Tempo Real. CT- Cycles Thereshold 51
Figura 14 - Fluxograma indicando a metodologia geral da pesquisa 53
Figura 15 - Mapa do estado de Roraima mostrando os limites estaduais e fronteiras 55
Figura 16 - Fluxograma do resultado obtido na pesquisa 67
Figura 17 - Curva de amplificação de amostras do CHIKV detectado por qRT-PCR. 68
Figura 18 - Observação por eletroforese dos produtos amplificados de amostras de CHIKV por RT-PCR. 69
Figura 19 - Regiões inicial e final da sequência de nucleotídeos da amostra 15/116 de CHIKV eliminadas na análise do cromatograma. 70
Figura 20 - Cromatograma da sequência consenso da amostra 15/116RR de CHIKV 71
Figura 21 - Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joinning usando as 03 cepas de CHIKV deste estudo, as do estudo de Acosta et al., (2015), ambas isoladas em Roraima e representantes dos 04 genótipos a nível mundial. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência de primers e sonda para CHIKV 58

Tabela 2- Sequências dos Primers para CHIKV modificados de Alphavírus 61

Tabela 3- Primers usadas para sequenciamento da região de interesse 62

Tabela 4- Sintomas clínicos apresentados na infecção por chikungunya......... 80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Situação epidemiológica de CHIKV em Roraima em 2014 e 2015 26

Quadro 2- Programa de amplificação da reação de sequenciamento 64

Quadro 3- Relação de similaridade das sequências de nucleotídeos de CHIKV obtidas em Roraima de janeiro a dezembro de 2015 com outras sequências do genótipo Asiático depositadas no GenBank. 72

Quadro 4- Relação de similaridade das sequências nucleotídicas entre as cepas identificadas em Roraima de casos autóctones e não autóctones 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

≤	Menor ou Igual
≥	Maior ou Igual
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
AMV-RT	Enzima Transcriptase Reversa Avian Myeloblastosis virus
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CHIKV	Chikungunya Vírus
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
Ct	do inglês Cycle thereshold ou Ciclo Limiar
ddNTP	Dideoxinucleotídeo Trifosfato
DENV	Dengue Vírus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotideo Trifosfato
ECP	Efeito Citopático
ECSA	Genótipo África Central Sul e Leste
EDTA	Ácido EtilenodiaminoTetra- Acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Álcool Etílico
H_2O	Água
IFI	Imunofluorescência Indireta
IOL	Linhagem Oceano Índico
Kb	Quilobase
L-15	meio de cultura Leibovitz's
Mg^{2+}	Íon Magnésio
$MgCl_2$	Íon Cloreto de Magnésio
MMLV-RT	Enzima Transcriptase Reversa Moloney Murine Leukemia Vírus
mRNA	RNA mensageiro
ONNV	O'nyong- Nyong Vírus
ORF	Open Reading Frame (Fase de Leitura aberta)
pb	Par de base
PEG	Polietilenoglicol
PII	Período de Incubação Intrínseco
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placa
q.s.p	Quantidade Suficiente para
qRT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real
QV	Quality Value
RNA	Ácido Ribonucleico
WA	Genótipo África Ocidental

Ser	Serina
Thr	Treonina

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 1

APRESENTAÇÃO..1

REFERENCIAL TEÓRICO.. 3

ARBOVÍRUS E ARBOVIROSES 3

CHIKUNGUNYA NO MUNDO E NAS AMÉRICAS 4

CHIKUNGUNYA NO BRASIL E EM RORAIMA.. 7

O VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV) 10

ORIGEM E EVOLUÇÃO DO CHIKV..12

PATOGÊNESE..14

O VETOR..17

CICLO DE TRANSMISSÃO DO CHIKV.. 20

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DISPONÍVEIS PARA IDENTIFICAÇÃO DO CHIKV 21

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase 22

RT- Transcrição Reversa.. 23

Eletroforese de Ácidos Nucleicos.. 25

PCR em Tempo Real (qRT-PCR) 26

OBJETIVOS 30

OBJETIVO GERAL 30

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.. 30

MATERIAL E MÉTODOS..31

PRINCÍPIOS ÉTICOS 31

DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO..31

AMOSTRAGEM.. 32

ISOLAMENTO VIRAL.. 33

EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.. 34

RT-PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR) 34

RT-PCR CONVENCIONAL - TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA POR UMA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE 35

Eletroforese- Análise dos fragmentos de DNA 37

SEQUENCIAMENTO 37

Purificação e quantificação do produto de PCR 37

Reação de sequenciamento 38

Análise e alinhamento das sequências 39

Análises Filogenéticas 39

ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE CHIKUNGUNYA 40

RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

OBTENÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA CHIKV POR QRT-PCR 41

SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA PROTEÍNA NSP1 43

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL NSP1 DO GENOMA DO CHIKV 44

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS APRESENTADAS PELO VÍRUS CIRCULANTE EM RORAIMA 49

CONSIDERAÇÕES FINAIS 53

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

ANEXOS 62

SOBRE A AUTORA 70

INTRODUÇÃO

APRESENTAÇÃO

Como resultado das mudanças nas atividades humanas e ecológicas, muitos arbovírus tem ressurgido em diversas regiões do mundo com potencial para epidemias, dentre as quais grande destaque se tem dado à chikungunya, infecção provocada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), que em sua grande maioria provoca febre elevada e artralgia dolorosa principalmente nos pequenos membros inferiores e superiores (DASH et al., 2007).

No Brasil, infelizmente, a introdução do vírus é uma realidade, tendo em vista o deslocamento de pessoas entre países e continentes, associado à presença de vetores competentes, como o mosquito *A. aegypti* (BRASIL, 2014a). O país registra casos de chikungunya em diversos Estados, incluindo Roraima.

O estado de Roraima possui posição geográfica estratégica podendo ser considerado uma importante porta de entrada para arbovírus ao Brasil (CATÃO, 2011).

As negociações comerciais entre o Brasil e os países da América do Sul pode ter desencadeado a vulnerabilidade a partir do acesso terrestre entre países como Venezuela e Guiana Inglesa (FIGUEIREDO, 2007). Aliado a isso, a presença populacional de mosquitos vetores, além do clima e vegetação adequados o ano inteiro complementam o cenário para entrada e disseminação dos vírus (BRASIL, 2014). Foi em Roraima que em 1981 ocorreu entrada de dengue ao Brasil, sendo identificada por isolamento viral os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (OSANAI et al., 1983).

Todavia, não bastasse a presença marcante dos quatro sorotipos de Dengue (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4), promovendo contínua infecção (ACOSTA et al., 2012), além da circulação de Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV) (MENESES, 2013), Roraima continua colecionando outros arbovírus dentre os quais citamos Chikungunya e o mais recente Zika (ZIKV) introduzido no Estado.

Durante o período do estudo, Roraima ainda não dispunha de uma técnica apropriada para detecção do CHIKV no Laboratório Central (LACEN/RR), tendo desta forma de ser realizado pelo instituto Evandro Chagas (IEC) no Pará, tornando o diagnóstico demorado. Por outro lado, o Centro de Estudos da Biodiversidade (CBio/UFRR), local base deste estudo, desenvolveu uma técnica apropriada para detecção do CHIKV (NASCIMENTO et al., 2015), assim como isolamento, identificação e caracterização molecular do vírus circulante (ACOSTA et al., 2015), utilizando técnicas de biologia molecular, como: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) uma das técnicas mais

adequadas para identificação do CHIKV por possuir maior sensibilidade, menor risco de contaminação, rapidez no diagnóstico e confiabilidade (PAHO/WHO, 2011), acresce ainda aqui o uso da RT-PCR convencional (RT-PCR), que além de igualmente detectar o vírus (BRASIL, 2014a), também torna possível a disponibilidade de fragmentos do genoma, permitindo a caracterização molecular por sequenciamento genômico, técnica importante na determinação da diversidade genética, facilitando o monitoramento da emergência de cepas com potencial epidêmico e de maior virulência.

Diante do exposto, considera-se de fundamental importância identificar o perfil genético do vírus para ampliar conhecimentos sobre o emergente arbovírus circulante no Estado. Portanto, o presente estudo dispôs da técnica para detecção do CHIKV aperfeiçoada pelo LaBMol-UFRR, para tornar possível o objetivo de identificar suas características moleculares. Para tanto, também foi determinado o perfil clínico da arbovirose durante o ano de 2015. Conhecer as características clínicas da enfermidade é importante, pois as arboviroses possuem sintomatologias semelhantes que dificultam o diagnóstico, porém as pequenas variações podem auxiliar no encerramento do caso, aliado ao diagnóstico laboratorial.

Assim espera-se que os dados produzidos neste estudo possam contribuir com a produção científica local e para o fornecimento de dados para a vigilância epidemiológica do Estado.

REFERENCIAL TEÓRICO

ARBOVÍRUS E ARBOVIROSES

As arboviroses são doenças causadas por um grupo de vírus denominados arbovírus, termo originado das duas primeiras letras das palavras que compõem a expressão inglesa ***ar**thropod-**bo**rne,* acrescida da palavra vírus (FARHAT; CARVALHO; SUCCI, 2007).

Os *arbovírus* são veiculados por artrópodes, são vírus de RNA zoonóticos, mantidos na natureza por ciclos complexos envolvendo principalmente mosquitos e carrapatos, que após serem infectados, transmitem o vírus para animais vertebrados como macacos, aves, roedores e humanos (FIGUEIREDO, 2007).

Os *arbovírus* têm uma distribuição geográfica bastante ampla abrangendo todos os continentes, com predominância nas regiões tropicais, por oferecerem condições ecológicas favoráveis o ano inteiro. A Amazônia brasileira destaca-se por ser uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, devido às condições climáticas, bem como à diversidade da fauna com grande variedade de artrópodes hematófagos e vertebrados silvestres, que constituem os elementos fundamentais para a manutenção destes vírus (TRAVASSOS DA ROSA et al, 1997).

Com base em suas propriedades físico-químicas, grande parte dos arbovírus que causam doença em humanos e em outros animais de sangue quente está distribuída em cinco famílias: *Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae* (FARHAT; CARVALHO; SUCCI, 2007).

A família *Togaviridae* foi definida como uma família distinta com dois gêneros: *Alphavirus*, que reúne vírus transmitidos por artrópodes, e *Rubivirus*, contendo uma única espécie, o vírus da Rubéola (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

O CHIKV é um *arbovírus* membro do gênero *Alphavírus*, da família *Togaviridae*, que provoca uma infecção similar ao dengue, tendo como vetores os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*; os mesmos envolvidos na transmissão do dengue; podendo, dessa forma emergir facilmente em áreas onde a dengue já está estabelecida (VAZEILLE; MOUSSON; FAILLOUX, 2009).

O CHIKV é um *arbovírus* membro do gênero *Alphavírus*, da família *Togaviridae,* que provoca uma infecção similar ao dengue, tendo como vetores os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*; os mesmos envolvidos na transmissão do dengue; podendo, dessa forma emergir facilmente em áreas onde a dengue já está estabelecida (VAZEILLE; MOUSSON; FAILLOUX, 2009). Nos seres humanos, a doença provocada pelo CHIKV é

auto limitante que na fase aguda, pode envolver alguns ou todos os seguintes sintomas: início súbito de febre, dor de cabeça, fadiga, náuseas, vômitos, exantema, mialgia e poliartralgia grave. Os sintomas podem durar até 10 dias, mas artralgia incapacitante pode persistir por meses, até anos em alguns pacientes (AGARWAL, 2014).Os sintomas podem durar até 10 dias, mas artralgia incapacitante pode persistir por meses, até anos em alguns pacientes (AGARWAL, 2014).

A palavra Chikungunya deriva de uma expressão em Makonde, o idioma do grupo étnico de mesmo nome, que vive no sudeste da Tanzânia e no norte de Moçambique. Significa “aquele que se curva”, descrevendo a aparência encurvada das pessoas que padecem da artralgia dolorosa, uma das características marcantes da infecção (PAHO/WHO, 2011).

A emergência e reemergência de CHIKV tem atraído a atenção mundial, principalmente pela rápida facilidade com que o vírus tem conseguido se expandir. A magnitude da epidemia tem surpreendido a população, formuladores de políticas e especialistas em saúde pública (SCHUFFENECKER et al., 2006), pois além do grave impacto relacionado à saúde pública, a infecção gera impacto econômico devido ao poder de incapacitar as pessoas infectadas, impedindo-as de desenvolver atividades rotineiras.

De acordo com Jaianand et al. (2010), o surto de CHIKV apresenta atualmente propagação maciça e acelerada causando sérios impactos econômicos e sociais. Entretanto, a preocupação com o espalhamento do vírus atingiu o pico em 2007, quando casos autóctones foram detectados no norte da Itália após o vírus ter sido introduzido por um viajante em regresso de área virêmica da Índia.

Embora a infecção pelo vírus não seja normalmente fatal, a doença pode deixar os acometidos semanas incapacitados pela forte artralgia, podendo ainda tornar-se uma séria ameaça à saúde pública, principalmente pela prevalência de mosquitos *Aedes*, especialmente em áreas tropicais onde existem vetores disponíveis (ROHANI et al., 2005). Ainda assim, o vírus tem causado epidemias com morbidade e sofrimento considerável, disseminando-se rapidamente para novas áreas, atravessando fronteiras e mares internacionais (PAHO/WHO, 2011).

CHIKUNGUNYA NO MUNDO E NAS AMÉRICAS

Desde que o CHIKV foi isolado pela primeira vez de soro humano em um surto na Tanzânia em 1952-1953 (ROBINSON, 1955), vários surtos **tê**m atingido o continente africano em regiões da África Oriental (Tanzânia e Unganda), África Austral (Zimbabwe e África do Sul), África Ocidental (Senegal e Nigéria) e África Central (República da África

Central e República do Congo) (SHAN; GIBBS; BANERGEE, 1964).

Em 1958, foi registrado o primeiro surto no continente asiático, precisamente em Bangkok e na Tailândia. Em ambos continentes apareceram reemergência com intervalos de 7 e 20 anos entre as epidemias consecutivamente (JOHNSTON, 1996; JUPP, 1988; PASTORINO, 2004 LARAS, 2005; SCHUFFENECKER et al., 2006; SOLIGNAT et al., 2009). Muitos destes surtos na África afetaram comunidades pequenas ou rurais, no entanto, na Ásia, cepas do CHIKV foram isoladas durante grandes surtos urbanos (PADBIDRI; GNANESWER, 1979).

No ano de 2004 ocorreu um surto no Quênia e, posteriormente, em Comores na costa leste da África, atingindo mais de 5000 casos notificados. Desde então, o vírus foi circulando para outras ilhas no Oceano Índico e em dezembro de 2005, com a estação das chuvas, deu-se origem a uma epidemia de proporção expressiva de circulação do vírus (PAQUET, 2006).

Nos dois anos seguintes, em 2006, milhares de casos foram relatados em Mayotte, Maurício, Seychelles e na ilha Reunión na França, a mais afetada das ilhas do Oceano Índico, onde foram identificados mais de 7 mil casos de CHIKV, representando uma taxa de ataque de 9,4/1000 habitantes (PAQUET, 2006). Em abril do mesmo ano, a epidemia já registrava uma estimativa de 244.000 casos da enfermidade e os primeiros casos documentados na ilha eram de pacientes que retornavam de Comores (PAQUET, 2006; SCHUFFENECKER et al., 2006). A epidemia alcançou a Índia no mesmo ano, causando um surto de grande escala, marcado por artrite febril que disseminou o vírus em muitas partes da Índia atingindo mais que 1.3 milhões de pessoas (DASH et al., 2007).

Lanciotti et al. (2006), ao estudar a presença de CHIKV em norte-americanos que retornavam de áreas endêmicas da Índia; confirmaram que a epidemia generalizada do vírus naquele país infectou os viajantes estrangeiros. Em 2010, o vírus continuou se propagando na Indonésia, Mianmar, Tailândia e nas Maldivas e reapareceu na Ilha Reunión (PAHO/ WHO, 2011). Nesse mesmo ano, foram identificados casos importados em Taiwan, na França, nos Estados Unidos e no Brasil. O vírus foi também documentado em Madacascar segundo Schuffenecker et al. (2006).

Nos estudos de Vieira (2010), além da França, foi relatado o surgimento de casos na Alemanha, Bélgica, Reino unido, Suíça, Noruega, República Checa, Espanha e Itália (com registro de 197 casos autóctones na República de Ravena com registro de 1 óbito). A disseminação ocorreu graças à infestação por *Aedes albopictus* na região e a identificação de um doente portador do vírus retornando de viagem da Índia.

Assim, a possibilidade de o CHIKV poder se implantar ou disseminar-se no continente

americano aumentou a consciência da necessidade de desenvolver diretrizes para a prevenção e controle nos países membros da Organização Pan Americana de Saúde, que lançou um manual de preparo à introdução do CHIKV no continente (PAHO/WHO 2011).

As investigações de Cassadou et al. (2014) forneceram evidências da primeira transmissão autóctone de CHIKV nas Américas, indicando um risco de epidemias tanto na América como na Europa através do substancial tráfego de passageiros entre continentes.

Em dezembro de 2013, dada confirmação da transmissão autóctone do CHIKV na região das Américas, na ilha do Caribe, San Martin (CASSADOU et al.,2014; LEPARC-GOFFART et al., 2014), a infecção foi em seguida documentada em aproximadamente 33 países e territórios da região com consequente disseminação para uma área abrangente do continente americano como pode ser visto no mapa (Figura 1) (PAHO/WHO, 2014).

Figura 1 - Distribuição geográfica de Chikungunya nas Américas- Semana 49 de 2013- semana 45 de 2015.
Fonte: PAHO/WHO (acesso em 07 de abril 2016).

A expansão iniciou a partir do foco no Caribe, progressivamente até a costa norte da América, América Central, o estado da Florida (USA), e nos últimos meses de 2014,

México, Brasil e os países da área Andina. Durante as primeiras semanas de 2015 o vírus já havia sido detectado no Paraguai e parte oriental da Bolívia (PAHO/WHO, 2015).

É importante conhecer os fatores específicos que tem conduzido a uma rápida expansão geográfica do vírus na região (PAHO/WHO, 2014). Neste contexto, a fim de que os laboratórios de referência assumissem o papel no diagnóstico e vigilância do vírus para identificação de casos autóctones, a Organização Pan Americana de Saúde (PAHO), propõe um algorítimo de detecção do CHIKV para os países membros, baseado na plataforma de vigilância da dengue (DENV), onde amostras de soro suspeitas são coletadas segundo critérios definidos como: febre > 38,5°C e grave artralgia ou artrite não explicada por outra condição médica, e indivíduo que reside ou visitou área conhecidamente endêmica para o CHIKV. Em seguida, são processadas de acordo com a fase aguda da doença, entre o 1° e 8° dia dos sintomas, para serem realizados testes de RT-PCR e detecção de IgM (PAHO/WHO, 2014).

De acordo com a Organização Pan Americana de Saúde, o vírus tem se espalhado na região das Américas, provavelmente devido à maior adaptação do vírus ao mosquito vetor, e a colaboração de determinantes ambientais e sociais, como alta temperatura, umidade, vegetação, chuvas e densidade populacional (PAHO/WHO, 2015).

CHIKUNGUNYA NO BRASIL E EM RORAIMA

O Brasil é um grande país tropical e apesar da contínua alta taxa de desmatamento, mais de um terço do território brasileiro ainda é coberto por florestas tropicais e outros ecossistemas naturais os quais oferecem condições ideais para a existência de muitos arbovírus causadores de infecções de grandes proporções como DENV, MAYV, OROV, CHIKV e o eminente ZIKV recém-introduzido no Brasil. Este grupo de vírus representa um problema de saúde preocupante em todo o mundo, e a introdução nas cidades brasileiras, que estão infestadas por vetores competentes, pode estar relacionada com a transição de viajantes humanos ou de mosquitos (FIGUEIREDO, 2007).

A movimentação de turistas por ocasião da Copa do Mundo em 2014 gerou preocupação com o risco de entrada do CHIKV no Brasil, todavia, é bastante difícil detectar oportunamente a doença em viajantes procedentes de áreas endêmicas e muito menos mantê-los isolados para evitar o contato com mosquitos vetores (TAUIL, 2014). A introdução e disseminação foi uma questão de tempo, dados os fatores favoráveis encontrados para adaptação do vírus no país, muito embora não seja possível afirmar que tenha sido introduzido por ocasião do evento mundial no Brasil (VASCONCELOS, 2014).

Em 2010, um relato de caso sugere a confirmação do primeiro caso importado de

CHIKV na cidade do Rio de Janeiro em um paciente em retorno da Indonésia. No entanto, não existem evidências de propagação nesse período (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Em 2013, após a confirmação da entrada do vírus nas Américas pela Ilha de San Martin, no Caribe, logo pôde ser confirmada em julho de 2014 a presença do vírus no Brasil em pacientes originários do Haiti e República Dominicana. O primeiro caso autóctone, foi registrado em setembro do mesmo ano no município de Oiapoque, no estado do Amapá, região norte do país, espalhando-se rapidamente para outras regiões (PORTAL DA SAÚDE, 2016).

Em outubro de 2014, foram notificados 3.657 casos de febre chikungunya em oito municípios pertencentes aos estados da Bahia, Amapá, Roraima, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal (BRASIL, 2016).

Em 2015, até a Semana Epidemiológica 52 (SE 52), foram notificados 20.661 casos autóctones distribuídos nos estados brasileiros (Figura 2). Destes, 7.823 foram confirmados, sendo 560 por critério laboratorial e 7.263 por critério clínico-epidemiológico; 10.420 continuam em investigação. Também foram registrados três óbitos por febre chikungunya, sendo 02 no estado da Bahia e 01 em Sergipe. Os óbitos ocorreram em indivíduos com idade avançada entre 75 e 85 anos e com histórico de doenças crônicas preexistentes (BRASIL, 2016).
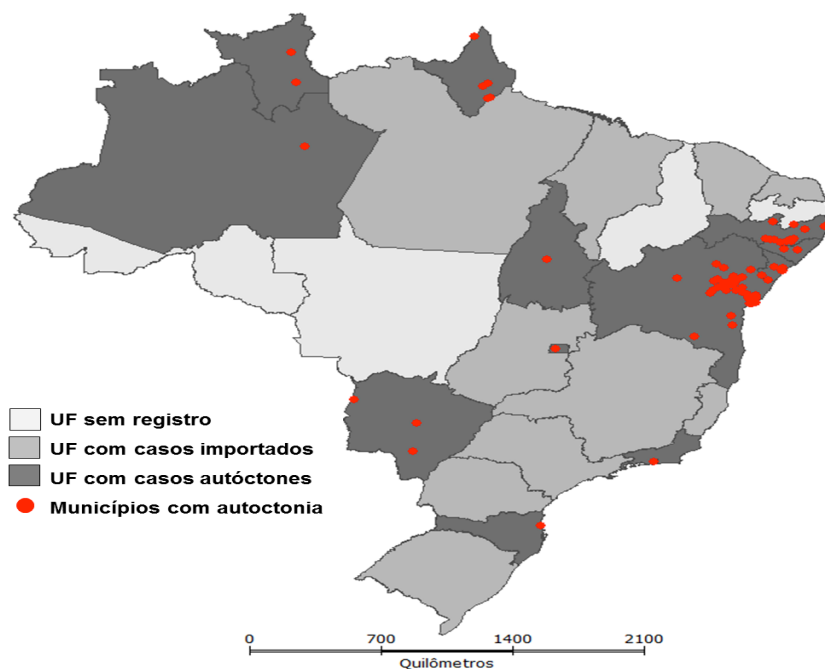
Figura 2 - Distribuição de casos importados e autóctones de febre chikungunya, Brasil, 2014 e 2015.
Fonte: Brasil, 2016 (acesso em: 08 Abr, 2016).

No norte do Brasil, o estado de Roraima destaca-se pela incidência de arbovírus, onde circulam os quatro sorotipos de Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), além da presença esporádica de Oropouche e Mayaro e agora Chikungunya e Zika. O primeiro caso de chikungunya confirmado pela Secretaria de Saúde em Roraima ocorreu em agosto de 2014 em uma turista em retorno de viagem a Venezuela, país vizinho (Portal G1, 2014). Desde então, o vírus espalhou-se atingindo até o final de 2014 200 casos notificados pela vigilância epidemiológica. A confirmação do primeiro caso autóctone aconteceu em janeiro de 2015 pelo Instituto Evandro Chagas (IEC). O caso ocorreu em uma idosa de 60 anos de idade que afirmou não ter viajado para outra cidade ou para fora do Estado (FOLHABV, 22 jan. 2015).

O panorama de casos de infecção por CHIKV no estado elevou-se no ano de 2015, quando foram notificados 455 casos distribuídos entre os municípios de Boa Vista, Cantá, Mucajaí e Rorainópolis (Quadro 1). Destes casos, apenas 18 foram confirmados laboratorialmente.

Casos notificados 2014	**200**
	Boa Vista Bonfim Mucajaí
Confirmados Laboratorialmente	**18**
Casos notificados 2015	**455**
	Boa Vista Cantá Mucajaí Rorainópolis
Confirmados Laboratorialmente	**18**

Quadro 1 - Situação epidemiológica de CHIKV em Roraima em 2014 e 2015.
Fonte: SINAN/NSIS/DVE/CGVS/SESAU/RR, 2016.

Os condicionantes que podem permitir a expansão do CHIKV no Brasil referem-se, em grande parte, ao modelo de crescimento econômico implantado na região, caracterizado pelo crescimento desordenado dos centros urbanos com importantes lacunas no setor de infraestrutura, tais como dificuldades para garantir o abastecimento regular e contínuo de água, a coleta e o destino adequado dos resíduos sólidos. Ressalta-se que mais de 80% da população do país está concentrada na área urbana. Outros fatores, como a acelerada expansão da indústria de materiais não biodegradáveis, além de condições climáticas favoráveis, agravadas pelo aquecimento global, conduzem a um cenário que impede a proposição de ações visando à erradicação do vetor transmissor (BRASIL, 2014a).

O VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)

A maior parte dos conhecimentos sobre estrutura e replicação do CHIKV está baseada no estudo sobre outros *Alphavírus* (STRAUSS e STRAUSS, 1994). Apesar de infectar milhões de pessoas desde sua descoberta e a infecção pelo vírus ser claramente responsável por artralgia persistente e incapacitante, segundo Schuffenecker et al., (2006), o conhecimento biológico sobre o vírus é escasso quando comparado a outros *Alphavírus* como, por exemplo, Ross River, Semliki Forest e Sindbis.

O CHIKV (Figura 3) é uma pequena partícula esférica medindo cerca de 60 - 70 nm de diâmetro. Possui Ácido Ribonucleico (RNA) como material genético, protegido por um envoltório proteico icosaédrico chamado de capsídeo. Cada capsídeo é composto por subunidades proteicas chamadas de capsômeros (ou proteína C). O capsídeo é circundado por um envelope de bicamada lipídica, cujo lipídeo é derivado da membrana plasmática do hospedeiro (STRAUSS e STRAUSS, 1994; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).
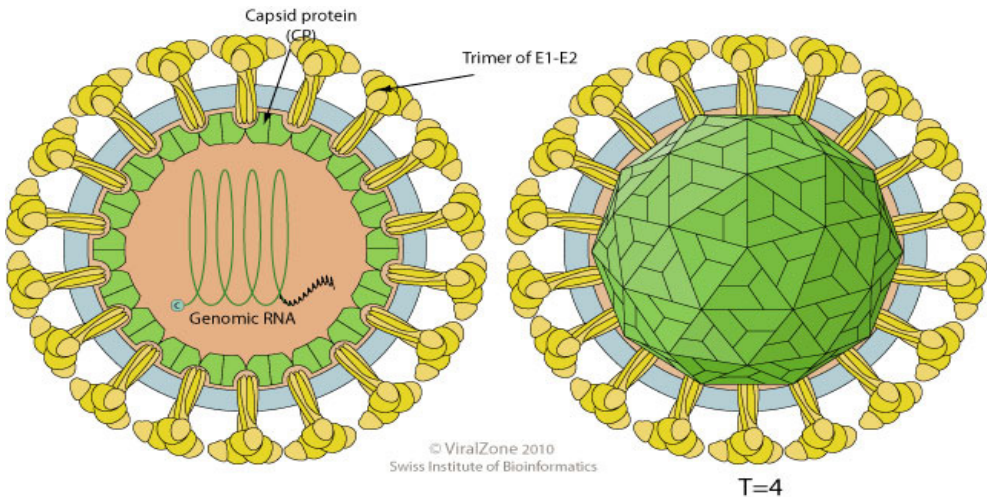
Figura 3 - Estrutura morfológica do CHIKV.
Fonte: ViralZone (acesso em: 23 abril 2016).

O genoma do CHIKV (Figura 4) é constituído por uma única molécula de RNA de sentido positivo com cerca de 11,7 quilobases (kb), sendo ligado ao lado interno do capsídeo (STRAUSS; STRAUSS, 1994; KHAN et al., 2002). Possui uma estrutura cap na extremidade 5' (7-metilguanosina) com presença de quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Na extremidade 3' poliadenilada (Poly A) estão presente as proteínas estruturais do capsídeo (proteína C) e as glicoproteínas de envelope viral E1 , E2 e E3 (STRAUSS; STRAUSS, 1994). De acordo com a organização genômica de outros *Alphavírus*, o genoma de CHIKV é considerado como sendo: 5'cap-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-

(região de junção) - C-E3-E2-6K-E1-poli (A) 3’ (KHAN et al., 2002).

O genoma viral se divide em duas fases de leitura aberta (do inglês Open Reading Frame- ORFs): uma que codifica as proteínas não estruturais, as quais ocupam dois terços da extremidade 5’ do RNA genômico; e outra que codifica as proteínas estruturais ocupando um terço da extremidade 3’ do genoma (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

A ORF das proteínas não estruturais possui 7.425 nucleotídeos, iniciando em um códon inicial (ATG) na posição 77-79 e finalizando em um códon de parada (TAG) na posição 7.499- 7.501; a qual codifica uma poliproteína de 2.474 aminoácidos (P123 e P1234) que dá origem às proteínas não estruturais por clivagem proteolítica. Por outro lado, a ORF das proteínas estruturais possui 3.735 nucleotídeos iniciado por um códon de início na posição 7.567-7.569 e finalizado por um códon de parada na posição 11.299-11.301. Esta ORF codifica uma poliproteína de 1.244 aminoácidos a partir do qual são formadas as proteínas estruturais (KHAN, et al., 2002).
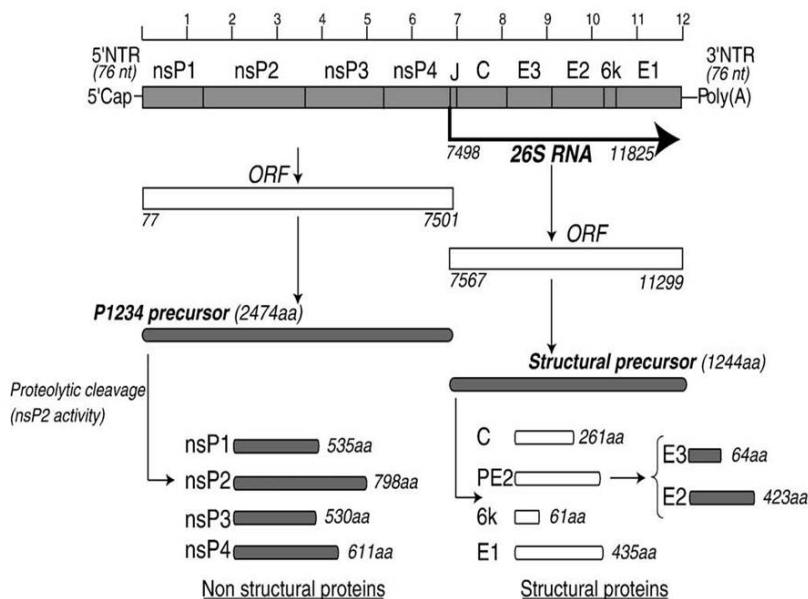
Figura 4 - Organização do genoma do CHIKV.
Fonte: SOLIGNAT et al. (2009).

A região estrutural é traduzida como uma poliproteína a partir da região de junção, formando o RNA 26S, que também é capeado e poliadenilado e serve como RNA mensageiro (mRNA) para síntese das poliproteínas de envelope E1 e E2, proteína C e 6K. A proteína E2 se forma a partir da clivagem de um precursor p62, que também dá origem a E3, esta última não permanece associada à partícula madura do CHIKV (STRAUSS; STRAUSS,

1994; LEUNG; MAH-LEE NG; HANN CHU, 2011;).

A proteína C possui comprimento de 261 aminoácidos enquanto que E3 consiste de 64 aminoácidos. A proteína E2 contém 423 aminoácidos e possui dois possíveis sítios de glicosilação na posição 263 e a proteína 6K possui um comprimento de 61 aminoácidos, enquanto que a proteína E1 contém 435 aminoácidos e um possível sitio de glicosilação foi identificado na posição 141. As proteínas estruturais apresentam importantes funções no processo de replicação, nos fatores de virulência, além de possuírem atividade hemaglutinante e de serem alvos de anticorpos neutralizantes (KHAN, et al., 2002).

O domínio não estrutural é traduzido pela clivagem de uma ou duas poliproteínas (P123 e P1234) do próprio RNA genômico durante o período de infecção após ser liberada no citoplasma. A poliproteína P123 possui as sequências para nsP1, nsP2, nsP3; enquanto que a poliproteína P1234 além destas possui a sequência para a proteína nsp4 (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

A característica das proteínas não estruturais reside no fato de que a nsP1 possui 535 aminoácidos de comprimento, sendo encontrados 17 aminoácidos conservados entre os *Alphavírus* próximo ao N-terminal de nsP1 na posição 31-47. A maior proteína não estrutural é a nsP2 com 798 aminoácidos de comprimento no CHIKV. A nsP3 tem 530 aminoácidos de comprimento. Por fim, a proteína nsP4 tem 611 aminoácidos e é a proteína mais conservada entre os *Alphavírus* (KHAN et al., 2002).

As proteínas não estruturais funcionam como poliproteínas durante a infecção e possuem importantes funções na transcrição e replicação do RNA (STRAUSS; STRAUSS, 1994; SCHUFFENECKER et al., 2006; LEUNG; MAH-LEE NG; HANN CHU, 2011;).

A variação na constituição genética do CHIKV, demonstrada por análises do genoma viral, classifica o vírus em quatro genótipos distintos, sendo dois africanos (África Ocidental- **WA**, África Central Sul e Leste – **ECSA**), um genótipo **Asiático** e mais recentemente a Linhagem Oceano Índico- **IOL** (POWERS et al., 2001; KRISHNA; REDDY; REDDY, 2006; SCHUFFENECKER et al., 2006; VASCONCELOS, 2014).

ORIGEM E EVOLUÇÃO DO CHIKV

O primeiro relato da doença ocorreu durante um grande surto no Planalto Makonde, no sul da província de Tanganica, África em 1952-1953, oriundo de uma infecção com sintomatologia similar ao dengue, com aparecimento súbito de febre, acompanhado em sua maioria com fortes dores nas articulações que por esse motivo logo um nome derivado do idioma local (Makonde) para distinguir a doença foi designado, que passou a ser conhecida por “chikungunya” (aquele que se curva), tendo sido isolado o vírus causador da infecção

de soro humano por Ross em 1953 (ROBINSON, 1955).

Acredita-se que o CHIKV tenha se originado na África e, subsequentemente, tenha sido importado para o sul da Ásia há aproximadamente 90 anos, onde o vírus é mantido em um ciclo urbano entre humanos e mosquitos A*edes aegypti* e *A. albopictus* (POWERS et al., 2000; SCHUFFENECKER et al., 2006). Essa hipótese é reforçada pelo fato de que na África o vírus é mantido em um ciclo silvestre entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes ssp, provavelmente* não existindo o ciclo silvestre fora do continente africano, além de que, as árvores filogenéticas corroboram evidências históricas de que o CHIKV tem origem africana (POWERS et al., 2001). É provável que o vírus circule no continente Africano e Asiático há centenas de anos ou mais, porém ainda não está claro em que parte da África o vírus primeiramente evoluiu (VOLK et al., 2010).

O estudo filogenético de Powers et al. (2000), baseado na origem geográfica de isolados da África e Ásia, estima que o genótipo asiático tenha evoluído de um ancestral africano cerca de 430 anos atrás.

Mais recentemente, em 2004, a linhagem de CHIKV do genótipo ECSA emergiu no Quênia e, subsequentemente, espalhou-se para Comoros e, em seguida, para outras ilhas do Oceano Índico, incluindo Mayotte, Seychelles, Madagascar, Sri Lanka, Maldivas e Reunión (TSETSARKIN WEAVER; 2011), onde o vetor predominantemente competente foi o *A. albopictus*, transmitindo preferencialmente uma variante do CHIKV com alteração única dO aminoácido (A) Alanina para (V) Valina na posição 226 da glicoproteína de envelope E1 do ECSA, resultando no IOL- linhagem Oceano Índico (E1-A226V) (SCHUFFENECKER et al., 2006).

Curiosamente, foi observado o aminoácido Alanina na posição 226 da proteína E1 no início do surto que ocorreu em março de 2005, porém em amostras de setembro do mesmo ano foi percebido um aminoácido Valina na mesma posição, evidenciando uma microevolução (SCHUFFENECKER et al., 2006), que provavelmente forneceu ao vírus a capacidade seletiva pelo mosquito *A. albopictus* e fator elevado de patogenicidade (SCHUFFENECKER et al., 2006; ARANKALLE et al., 2007; NIYAS et al., 2010*).*

Em Kerala, Índia, no sequenciamento parcial das proteínas E1, E2e nsP2 do genótipo ECSA foi identificada uma substituição de aminoácidos considerável em amostras humanas de 2009 e em mosquitos adultos na região de codificação da proteína E2, resultando em E2-L210Q (alteração de Leucina por Glutamina) (NIYAS et al; 2010). O estudo mostrou ainda uma aptidão seletiva dessa substituição ao mosquito *A. albopictus*, aumentando a infecção inicial das células intestinais do mosquito, todavia, E2-L210Q, não mostrou melhor aptidão para o vetor principal *A. aegypti,* muito embora mostre uma aparente contínua

evolução do CHIKV (TSETSARKIN et al, 2011).

Arankalle et al. (2007) encontraram quatro mutações nos isolados do genótipo ECSA da epidemia na Índia de 2005-2006 quando comparados ao protótipo S27, sendo duas alterações de aminoácidos na região da proteína não estrutural nsP1 (T128K e T376M), além de duas mutações na região do capsídeo (P23S e V27I). O mesmo estudo comparou o genótipo Asiático de CHIKV com o protótipo S27, observando muitas alterações de aminoácidos entre eles, no entanto, ao comparar o mesmo genótipo Asiático com isolados de diferentes períodos (1963 e 1973), observou uma identidade entre elas de 99,72% na região da proteína não estrutural e 99,44% na proteína estrutural (ARANKALLE et al., 2007). O fato do genótipo Asiático não ter sido reportado na África e o registro histórico sugerir surtos de febre chikungunya na Ásia desde 1979 (TSETSARKIN et al; 2011), sugere fortemente a evolução independente do ancestral africano de CHIKV na Ásia para diversos países, resultando no genótipo Asiático. O que explicaria a razão da grande divergência entre eles (NG; HAPUARACHCHI, 2010).

Na Ásia, os estudos do CHIKV apresentam um vírus com sequências nucleotídicas altamente conservadas com divergência menor que 3% entre as estirpes ao longo de 35 anos, fator intrigante para um vírus conhecido por ser mantido apenas entre humanos e mosquitos peridomiciliares (POWERS et al., 2000). Muito embora, a frequência de infecção por CHIKV na Ásia seja muito superior ao que ocorre na África, fator atribuído muito provavelmente ao vetor, pois ao contrário do que ocorre no continente africano, onde os variados vetores envolvidos são de espécies silvestres, que podem infectar humanos, na Ásia, os mosquitos vetores, conhecidos por transmitir o vírus, são espécies antropofílicas peridomiciliares, que mantém constante contato com o homem (POWERS et al., 2000).

Já foi postulada a ideia de que mutações no CHIKV levaram ao surgimento do vírus O'nyong-nyong (ONNV) e sua capacidade de ser transmitido por mosquitos anofelinos. No entanto, estudos genéticos e filogenéticos demonstram que se tratam de espécies distintas (LANCIOTTI et al; 1998; POWERS et al., 2000; VOLK et al., 2010; COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014;).

PATOGÊNESE

A forma clássica da doença (Figura 5) inclui sintomas gripais inespecíficos (CAGLIOTTI et al.; 2013), caracterizado por início súbito de febre, em geral maior que 38,5°C, com intensa dor nas articulações (BORGHERINI et al., 2007) que pode durar meses a anos após a resolução da infecção aguda (SOUMAHORO et al., 2009; TAUIL, 2014).

A história clínica revela que a artralgia envolve principalmente as pequenas

articulações de mãos e pés evoluindo para o pulso, falange, tornozelo e joelho. Edema também pode ser visto frequentemente associado com tenossinovite (DASH et al., 2007). Outros sinais clínicos incluem cefaleia, fadiga, náuseas, vômitos, erupção cutânea e mialgia (DASH et al., 2007), dor difusa nas costas, conjuntivite, que podem permanecer por até 10 dias (PAHO/WHO, 2011).

A febre que dura até uma semana, pode ser contínua e intermitente; porém a queda na temperatura pode ser associada a uma bradicardia relativa. Metade dos pacientes relata apresentar exantemas, normalmente após o segundo dia febril. As erupções cutâneas maculopapulares envolvem o tronco e as extremidades, podendo afetar as regiões palmar, plantar e facial. Em crianças, as manifestações cutâneas mais comuns são as do tipo vesículo-bolhosas (BRASIL, 2014b).
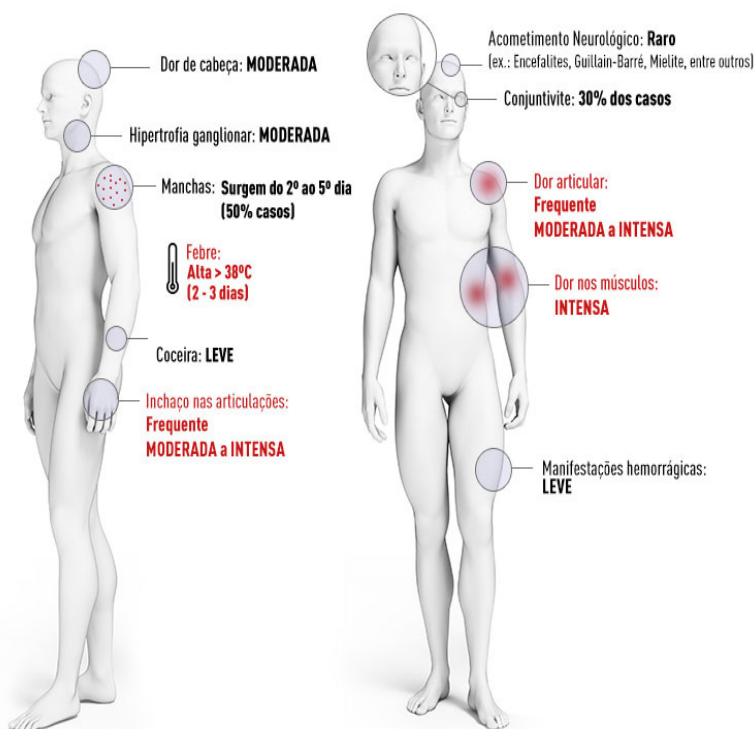
Figura 5 - Sintomatologia Geral da infecção por chikungunya.
Fonte: Portal da Saúde/ SUS (acesso em: 12 abril de 2016).

Alguns pacientes podem desenvolver distúrbios vasculares periféricos e além dos sintomas físicos, a maioria reclama de sintomas depressivos, cansaço geral e fraqueza (BRASIL, 2014b).

Manifestações atípicas raras podem ocorrer devido a efeitos diretos do vírus e a

resposta imunológica do paciente (PHO/WHO, 2011). Durante o surto no Oceano Índico, um dos sinais clínicos graves desenvolvidos foram os neurológicos. Entretanto, não ficou totalmente elucidado se as cepas de CHIKV, neste surto, adquiriram uma maior neurovirulência ou neuroinvasividade, comum aos *Alphavírus* (SCHUFFENECKER et al.; 2006).

Casos de transmissão vertical grave também já foram relatados, conforme Paquet et al (2006), que descreveram a confirmação do diagnóstico de CHIKV em recém-nascidos pelo Centro de Referência Nacional Francês de Arbovirologia: "*Os bebês apresentavam sintomas agudos da infecção e meningoencefalite [...], as mães tiveram infecção aguda de chikungunya nas 48 horas antes do parto*".

Apesar da maioria das infecções durante a gestação não resultar em contaminação fetal, existe, no entanto, raros relatos de abortos espontâneos, para Figueiredo (2007), porém, o risco maior de transmissão parece ser durante o período intraparto, em que os bebês possuem maior risco de desenvolver as doenças neurológicas, mas, em geral, ao nascimento eles são assintomáticos e então desenvolvem os sintomas típicos do CHIKV (BRASIL, 2014b).

A família *Togaviridae*, ao qual o CHIKV faz parte, reúne vírus que são conhecidos por serem neurotrópicos e causarem meningoencefalite humana na América do Norte e do Sul. Todavia, a longo prazo ainda não é possível medir as consequências no desenvolvimento psicomotor das crianças afetadas (PAQUET et al, 2006).

Outros sinais clínicos atípicos já relatados foram encefalopatia, convulsões, síndrome de Guilain-Barré, síndrome cerebelar, paresia, paralisia, neuropatia, sinais oculares como neurite óptica, retinite e uveíte. Sinais cardiovasculares: miocardite, arritimias e insuficiência cardiovascular. Irritações dermatológicas como hiperpigmentação fotossensível e dermatose vesículo-bolhosa; além de nefrite e insuficiência renal aguda (PAHO/WHO, 2011).

A distribuição dos grupos de risco parece homogênea, a infecção pode afetar homens e mulheres de todas as idades, embora haja uma pequena predominância em mulheres (PAQUET, 2006; BORGHERINI et al., 2007; DASH et al., 2007). A apresentação clínica também pode variar de acordo com a idade, neonatos e idosos acima de 65 anos formam o grupo de maior risco para pior evolução da doença e também para a não recuperação (BRASIL, 2014b). De acordo com Tauil (2014), idade avançada, presença de doença crônica concomitante e maior intensidade das dores na fase aguda contribuem para a persistência da poliartralgia.

Embora não seja comum a mortalidade pelo CHIKV, esta infecção pode deixar os

acometidos incapacitados ou acamados decorrentes da intensa dor, edema e a rigidez, que os impedem de executar tarefas normais (SCHUFFENECKER et al.; 2006; PAHO/WHO, 2011;). No entanto, houve um aumento nas taxas de mortalidade durante os surtos na Índia, em Maurício (BEESOON et al., 2008), e na Ilha Reunión, onde as mortes relatadas por Borgherini et al. (2007), em geral, ocorreram em pacientes com idade avançada (média de 79 anos) e que apresentavam alguma doença subjacente, como cardiopatia isquêmica, miastenia, diabetes, câncer gástrico e infecção por *Eschechia colli.*

A susceptibilidade à infecção é determinada pela prévia exposição do hospedeiro humano ao vírus após a picada do mosquito vetor infectado; portanto, todos os indivíduos não expostos são susceptíveis de adquirir o CHIKV e desenvolver a doença. Uma vez exposto, o sistema imunológico é estimulado a produzir anticorpos. A interação entre os anticorpos do hospedeiro e as proteínas virais, inativa o vírus e interrompe a infecção quando em nova exposição (PAHO/WHO, 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; BRASIL, 2014a). Os mecanismos de defesa inatos podem estar envolvidos na dinâmica dos principais sinais da infecção e o estabelecimento da doença crônica persistente (CAGLIOTTI et al.; 2013), podendo apresentar a enfermidade na forma aguda ou crônica (PAHO/WHO, 2011).

De acordo com Rossetti (2016), na fase aguda, o vírus está normalmente presente nas áreas onde os sintomas estão presentes; músculos esqueléticos especificamente e articulações. Na fase crônica, a persistência viral e a falta de depuração do antígeno contribuem para a dor articular. A resposta da inflamação durante a fase aguda e crônica da doença resulta em parte das interações entre o vírus com monócitos e macrófagos.

O processo de infecção do CHIKV em seres humanos ainda é mal compreendido em seus detalhes moleculares (ROSSETTI, 2016). Todavia, estudos experimentais, demonstram que é um arbovírus que se multiplica inicialmente nos gânglios linfáticos regionais da área da pele picada pelo vetor infectado. Desse ponto o agente viral alcança a corrente sanguínea através dos vasos linfáticos, disseminando-se pelos órgãos e tecidos do hospedeiro. O vírus se multiplica nesses locais, sendo lançado novamente na corrente sanguínea, determinando a viremia que corresponde ao período febril (FARHAT; CARVALHO; SUCCI, 2007).

O VETOR

Os principais vetores envolvidos na transmissão do CHIKV são os mosquitos do gênero Aedes: *A. aegypti e A. albopictus*, ambos amplamente distribuídos em todos os trópicos e o *A. albopictus* também está presente em latitudes mais temperadas (PAHO/WHO, 2011).

O *Aedes aegypti,* (Figura 6) é originário do velho mundo, provavelmente da

África, onde se domesticou e se adaptou ao ambiente criado pelo homem, tornando-se antropofílico. Foi introduzido no Brasil no período do tráfico de escravos, tendo achado aqui condições ideais para sua proliferação. É encontrado nos locais de maior concentração humana e raramente em ambientes semi-silvestres e sua maior densidade populacional ocorre durante o período chuvoso, embora resista a períodos mais secos à custa dos criadouros artificiais (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; LIMA-CAMARA; TEXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999; HONÓRIO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2006).

Figura 6 - Principal vetor do vírus Chikungunya- mosquito Aedes aegypti.
Fonte: Portal G1.com (acesso 12 de abril 2016).

O *A. albopictus* foi originalmente descrito na Índia, sendo amplamente disseminado no mundo, porém, a população introduzida desse mosquito no Brasil parece ser oriunda do Japão, sendo o primeiro registro da espécie realizado em 1986 nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, invadindo progressivamente outros estados vizinhos como Espirito Santo e São Paulo (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994). Cria-se em recipientes naturais e artificiais; preferindo os ocos de árvores para depositar seus ovos. Espalha-se com facilidade em ambientes silvestres e suburbanos, podendo tornar-se uma ponte entre os ciclos silvestres e urbanos; além disso, o mosquito é tolerante às baixas temperaturas. Suas fêmeas depositam seus ovos resistentes à dessecação aos poucos, em vários recipientes diferentes, facilitando a dispersão da espécie. Possui hábitos diurnos e é bastante eclético quanto à escolha de seu hospedeiro (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; TEXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999; LIMA-CAMARA; HONÓRIO;

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2006; BARRETO; TEXEIRA, 2008). Alencar et al. (2008) afirmaram que o *A. albopictus* tornou-se um potencial vetor para diversas arboviroses, seu controle no entanto, é muito importante, já que muitas dessas doenças são consideradas emergentes no Brasil.

Os ovos de ambos os mosquitos são depositados fora da água, nas paredes internas e úmidas dos recipientes naturais ou artificiais e, após rápido desenvolvimento embrionário, são capazes de se manter viáveis por longos períodos, mesmo em condições desfavoráveis de dessecação. Os mosquitos vetores (artrópodes) são os reais reservatórios de CHIKV, além de desempenhar papel de transmissor e, uma vez infectado, permanecem assim pelo resto da vida em todas as partes de seu corpo. Assim, os ovários podem ser atingidos proporcionando a transmissão transovariana ou vertical; considerada como sendo o principal meio pelo qual alguns arbovírus são mantidos em condições ambientais adversas (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; AGARWAL et al.; 2014).

Embora o *A. albopictus* possa ser considerado vetor secundário, ambos os vetores, resguardada suas particularidades, estão aptos a adquirirem o CHIKV bem como de transmiti-lo a hospedeiros vertebrados, principalmente o homem, desencadeando a febre chikungunya (LIMA-CAMARA; HONÓRIO; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 2006). Na Índia, durante o surto de 2008, a infecção esteve relacionada com maior prevalência em *A. albopictus* (SANTHOSH, 2009), o mesmo ocorreu para o surto na ilha Reunión, e mesmo que outros mosquitos estivessem envolvidos, o *A. albopictus* pôde ser considerado vetor bastante competente para a disseminação da infecção (SCHUFFENECKER et al.; 2006; VAZZEILLE, MOUSSON, FAILLOUX, 2007; ALENCAR et al.; 2008).

O estudo de Honório e Lourenço de Oliveira (2001), em concordância com outros estudos, observou maior frequência de larvas de *A. albopictus* em comparação com *A. aegypti* em pneus usados como armadilhas em um município do Rio de Janeiro durante a maioria dos meses estudados; evidenciando assim certa sobreposição dessa espécie nos criadouros artificiais.

A distribuição espacial das espécies é influenciada principalmente por fatores ambientais e de comportamento humano e dos próprios mosquitos. Os machos e fêmeas de *A. aegypti* costumam ser mais frequentes em ambientes urbanos, no entanto, os *A. albopictus* apresentam distribuição oposta; embora ambos possam ser adaptáveis aos dois ambientes. No Brasil, o *A. aegypti* está amplamente distribuído em 4.318 municípios, enquanto o *A. albopictus* é encontrado em 2.126 municípios (BRASIL, 2014a).

Uma vez que as fêmeas dos vetores hematófagos necessitam do repasto sanguíneo

para o desenvolvimento e maturação dos ovos e para aumentar sua longevidade; a contaminação humana e/ou do mosquito pelo CHIKV ocorre após a picada destas, que são mosquitos vorazes e atacam durante o dia (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

O mosquito vetor uma vez infectado pelo vírus permanece assim por toda sua vida, podendo, no entanto, hospedar uma coleção de diversos vírus, desempenhando um papel de seleção durante epidemias, implicando em situações de co-infecção, principalmente em regiões que circulam conjuntamente DENV, CHIKV e ZIKV e que possuem os dois mosquitos *A. aegypti e A. albopictus* como vetores (COFFEY, FAILLOUX, WEAVER; 2014).

CICLO DE TRANSMISSÃO DO CHIKV

A transmissão envolve dois ciclos distintos: um selvagem e outro urbano (Figura 7). O ciclo selvagem do CHIKV ocorre na África, envolvendo primatas selvagens na floresta e mosquitos *Aedes spp,* tais como *A. luteocephalus, A. furcifer ou A. taylori.* De outra forma, na Ásia e na Índia o ciclo é mantido através de uma transmissão urbana, transmitida para humanos principalmente por *A. aegypti* e em menor grau por *A. albopictus* (JUPP; MC INTOSH, 1985; apud GUBLER, 1998; POWERS et al., 2001; SCHUFFENECKER et al., 2006; VAZEILLE; MOUSSON; FAILLOUX, 2009). De acordo com Powers et al. (2001), ainda não foi identificado um ciclo de transmissão selvagem envolvendo vertebrados fora da África.
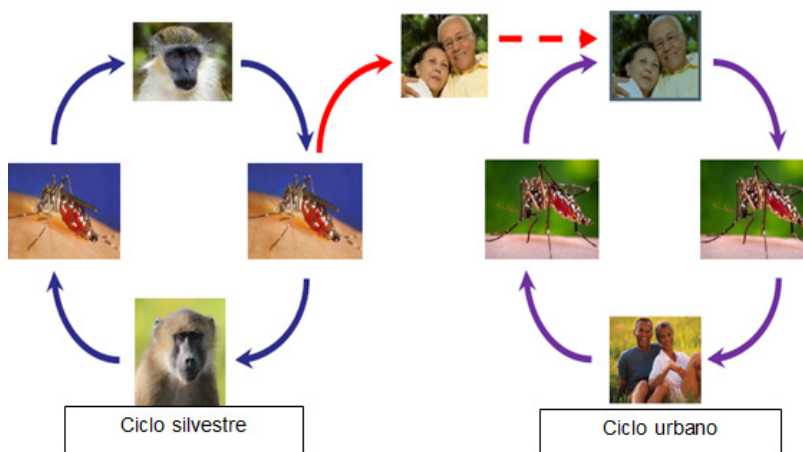
Figura 7 - Os ciclos de Transmissão do CHIKV.
Fonte: CDC, 2015 (acesso em abril de 2016).

O processo de infecção e transmissão do CHIKV pelo vetor (Figura 6) ocorre com a ingestão do vírus pelo mosquito de um hospedeiro vertebrado. Durante a incubação extrínseca, período que ocorre no vetor, o CHIKV invade o intestino médio e dissemina-

se através da cavidade do corpo, invadindo as glândulas salivares tornando-se capaz de infectar um hospedeiro (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014).

A transmissão humana ocorre no momento da realimentação sanguínea pelo mosquito vetor, que infecta o hospedeiro vertebrado ao expelir o vírus através da saliva. Uma vez infectado, o vírus passa por um Período de Incubação Intrínseco (PII) médio de 3-7 dias e intervalo de 3- 12 dias, no qual aparecem os sinais da fase aguda da doença determinando o período de viremia (Figura 8) (SÃO PAULO, 2014). Um novo vetor perpetua o ciclo ao ingerir o vírus durante alimentação do sangue contaminado de um hospedeiro vertebrado (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014).
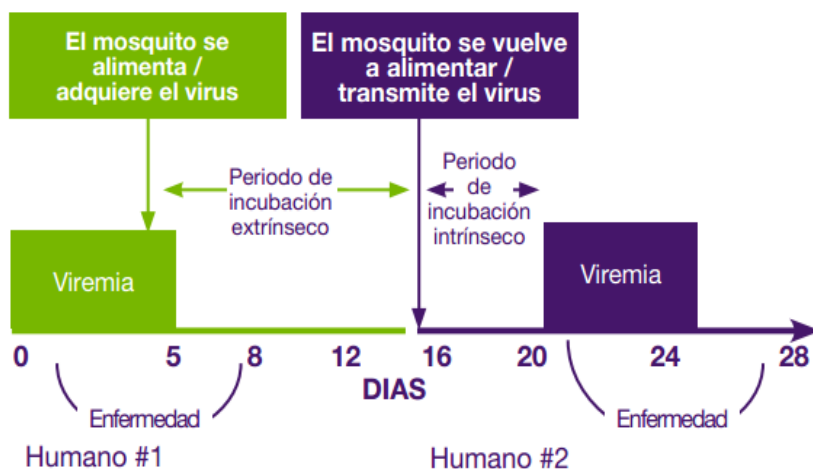
Figura 8 - Período de incubação Intrínseco e Extrínseco do CHIKV.
Fonte: Center for Desease Control na Prevention-CDC e OPAS/OMS (2011).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DISPONÍVEIS PARA IDENTIFICAÇÃO DO CHIKV

Os principais testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico de CHIKV são:

- Sorologia - (ELISA- *enzyme-linked immunosorbent assay*; PRNT- Teste de Neutralização por Redução de Placa)- para o teste sorológico utiliza- se soro de sangue total, para fazer demonstração de anticorpos IgM específico para CHIKV por ELISA e por um aumento de quatro vezes no título de PRNT entre amostras de fase aguda e convalescente.
- Isolamento viral – pode-se realizar em mosquitos recolhidos em campo e em soro de fase aguda que são inoculados em linhagem de células sensíveis onde o vírus produzirá efeito citopático (ECP) típico dentro de três dias após sua inoculação. A identificação do vírus deve ser realizada por Imunofluorescência Indireta (IFI) utilizando antissoro CHIKV ou por RT-PCR utilizando sobrenadante de cultura.

- RT-PCR- dentre os métodos disponíveis para diagnóstico, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) para detecção do RNA destaca-se entre os demais, principalmente pela redução do tempo do resultado, sendo recomendado o uso da RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR), devido sua maior sensibilidade e menor risco de contaminação frente a RT-PCR convencional (PAHO/WHO, 2011). As amostras para a prova podem ser soro de sangue total recolhida em período de fase aguda até o oitavo dia, mas em casos neurológicos, líquido cérebro-espinhal também pode ser usado (BRASIL, 2014b).

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica utilizada para fazer cópias ilimitadas de gene in vitro, iniciando-se de uma única molécula de DNA (SCIENCE IS ART, 2008). A técnica foi idealizada pelo cientista Kary B. Mullis em 1983, durante viagem através das montanhas da Califórnia (MULLIS, 1990). Inicialmente ao ser concebido, o experimento se valia do uso da enzima DNA Polimerase extraído de bactéria *Escherichia coli,* reagentes simples, oligonucleotídeos e uma fonte de calor entre os ciclos, necessários para desnaturar a dupla fita de DNA (MULLIS, 1990).

Uma das desvantagens do método era a termolabilidade da enzima usada para catalisar a extensão dos iniciadores hibridados, a qual era irreversivelmente inativada durante a desnaturação térmica que separa as duas fitas de DNA recém-sintetizadas, tendo de ser adicionada nova enzima no início de cada ciclo, tornando o método demorado e passível de erros se várias amostras fossem amplificadas simultaneamente (MULLIS et al., 1986; 1988).

A deficiência do método foi posteriormente corrigida ao se fazer uso de uma DNA Polimerase termoestável a temperaturas em torno de 95°C, isolada a partir da bactéria *Thermus Aquaticus* (Taq Polimerase). Essa modificação não somente simplificou o processo, tornando-a passível de automação, como também melhorou o desempenho geral da reação, aumentando especificidade, rendimento, sensibilidade e comprimento de produtos a serem amplificados (MULLIS et al., 1988).

Em síntese, a técnica de amplificação ocorre de modo semelhante ao que acontece com a replicação natural do DNA (OLIVEIRA et al., 2007; NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2007). Para tanto, a reação requer um par de oligonucleotideos iniciadores específicos, denominados primers (um direto e um reverso), amostra alvo de DNA, desoxinucleotideos trifosfatados (dNTPs: dGTP, dCTP, dATP e dTTP), Taq Polimerase de DNA, Magnésio (Mg^{2+}) e tampão da reação (MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002).

Primers são pequenas sequências conhecidas de DNA que se ligam por complementariedade de bases à região alvo de DNA ou template (GUATELLI; GINGERAS;

RICHMAN, 1989) e atuam como um substrato para a enzima DNA polimerase, que cria uma cadeia complementar através da adição sequencial de dNTPs (MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002). O Mg^{2+} funciona como cofator indispensável para o funcionamento da enzima Taq DNA-Polimerase, enquanto que o tampão atenua as variações de pH e fornece diversos íons (Na+, Cl-, K+, entre outros), que otimizam as condições da reação; por fim, a enzima DNA-Polimerase é responsável pela síntese das novas fitas de DNA (OLIVEIRA et al., 2007).

O método consiste de repetidos ciclos de três etapas subsequentes (Figura 9), que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação em um mesmo tubo, e correspondem a:

- desnaturação da dupla fita de DNA alvo que ocorre à temperatura acima de 90°C; quebra as ligações de hidrogênio, que mantêm as fitas unidas, deixando-as expostas.
- anelamento ou hibridização dos primers que se encaixam nas respectivas bases complementares, durante a rápida redução da temperatura para 50-75°C, e;
- extensão pela Taq DNA-Polimerase a uma temperatura ótima para a enzima em torno de 72-78°C. A síntese da nova fita se inicia a partir dos primers no sentido 5' para 3' pelo fornecimento de nucleotídeos a sequência alvo (MULLIS et al., 1986; MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002; KUBISTA et al., 2006; OLIVEIRA, et al., 2007; CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010; MARTINS, 2014).

A quantidade de produto duplica a cada ciclo, resultando em acumulação exponencial de um fragmento específico (MULLIS et al., 1988). O número de ciclos depende da quantidade de sequência alvo presente e da eficiência da reação (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999). A taxa de mudança de temperatura, a duração de incubação em cada temperatura e o número de vezes que o ciclo térmico é repetido são controlados por um aparelho termociclador programável (MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002).
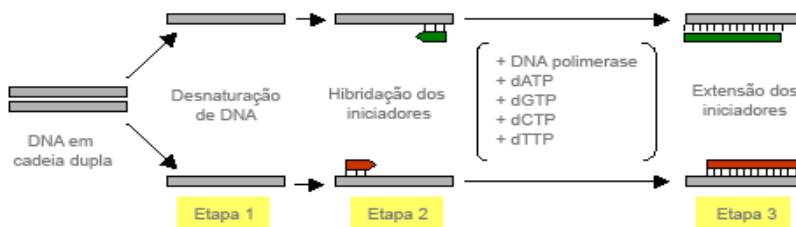
Figura 9 - Etapas da PCR.
Fonte: e- escola, 2005 (acesso em: 13 de março 2016).

RT- Transcrição Reversa

A detecção de vírus de RNA é possível aplicando-se uma prévia reação de

Transcrição Reversa (RT), seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Tal procedimento provou ser muito útil na detecção de muitos vírus de RNA trazendo uma contribuição significativa para os trabalhos realizados dentro da pesquisa com arboviroses (OKINO, 2007).

Transcrição reversa é a formação de DNA fita simples (cDNA) a partir de RNA por uma DNA polimerase RNA-dependente, ou seja, a enzima transcriptase reversa (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011). O cDNA sintetizado pela transcriptase reversa corresponde à forma mais conveniente de se manipular a sequência de codificação do RNA, pois ele é uma molécula facilmente degradada por enzimas denominadas RNAses (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2007).

Em geral, podem ser utilizados dois tipos principais de enzimas transcriptase reversa: Moloney Murine Leukemia virus (MMLV-RT) e Avian Myeloblastosis virus (AMV-RT) (BROOKS; SHEFLIN; SPAULDING, 1995). Além disso, é imperativo o uso de oligonucleotídeos iniciadores na reação. O primer pode ser uma sequência de oligonucleotídeos específica ou não específica ao RNA; ambos possuem vantagens e desvantagens (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999).

O Oligo-dT, é um primer contendo 18 timidinas (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011), que anelam-se facilmente à cauda de poliadenosinas na extremidade 3’ na maioria dos RNAs. (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999; NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2007). Outra opção é um coquetel de primers chamado de “Random primer”, que possui sequências aleatórias de seis a nove nucleotídeos (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2007), contendo todas as possíveis combinações das quatro bases nitrogenadas e se ligam a todos os RNAs presentes (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999; NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2007). Como existem todas as combinações possíveis na mistura destes primers, os mesmos podem ligar-se em qualquer parte do RNA. Portanto, tais primers poderão também hibridizar com moléculas de RNA transportadores e RNA ribossômicos, podendo, deste modo, interferir na conversão exclusiva dos RNAs mensageiros em cDNA (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2007). A terceira opção pode ser uma sequência de oligonucleotídeos específica ao RNA alvo, é a estratégia preferida quando um número limitado de RNAs serão analisados (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2007). Ao contrário da reação de RT usando primers inespecíficos; nos protocolos que utilizam primers específicos, é realizada uma reação para cada gene de interesse (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999).

Além disso, são ainda requeridos para reação de síntese de cDNA, o alvo de RNA, desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs: dGTP, dCTP, dATP e dTTP) e íons magnésio (Mg2+), que atuam aumentando os pontos de interação entre os dNTPs e a enzima (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011). Dessa forma, o primer anela-se ao RNA, e o cDNA é então

estendido da extremidade 5' do RNA através da atividade da enzima transcriptase reversa, formando o cDNA (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999). A transcrição reversa ocorre mediante um ciclo térmico em geral a 42°C, por 30 a 60 minutos em um termociclador. Após a obtenção do cDNA, uma alíquota desta amostra é utilizada para a reação de amplificação por PCR (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2007).

Eletroforese de Ácidos Nucleicos

A eletroforese (Figura 10) é a migração de uma molécula carregada sob a influência de um campo elétrico. É uma técnica analítica simples e muito eficiente para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA e de proteínas de acordo com sua carga elétrica e seu peso molecular. Moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo) (OLIVEIRA et al., 2007).

Ao final da reação de RT-PCR, a detecção do produto (os amplicons) é realizada por meio de uma eletroforese em gel na presença de corante intercalador de DNA. A análise visual das bandas resultantes é possível após irradiação do gel por luz ultravioleta (KIDD; CLARK; EMERY, 2000 apud MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002). A análise eletroforética dos produtos de PCR permite a verificação de seus tamanhos e homogeneidade por comparação com padrões lineares de DNA (GUATELLI; GINGERAS; RICHMAN, 1989).

O princípio da detecção de ácidos nucleicos por eletroforese é baseado no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em decorrência do grupamento fosfato e migram sempre em direção ao pólo positivo. A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso em um dado momento da eletroforese moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz (CORRÊA; POSSIK, 2016). O tipo de matriz usada, seja gel de agarose ou poliacrilamida, depende do tamanho dos fragmentos de DNA que se pretende separar e visualizar. O gel de agarose, normalmente é utilizado para separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1kb- corresponde a 1000 pares de bases). Enquanto que o gel de poliacrilamida utiliza-se para separação de fragmentos pequenos, de até 1kb (CORRÊA; POSSIK, 2016). A migração ocorre através do sistema tampão disperso ao meio que consiste em duas partes: o tampão usado na preparação do gel e o tampão da cuba eletrolítica, na qual se encontram os eletrodos (ânodo e cátodo) (OLIVEIRA et al., 2007).
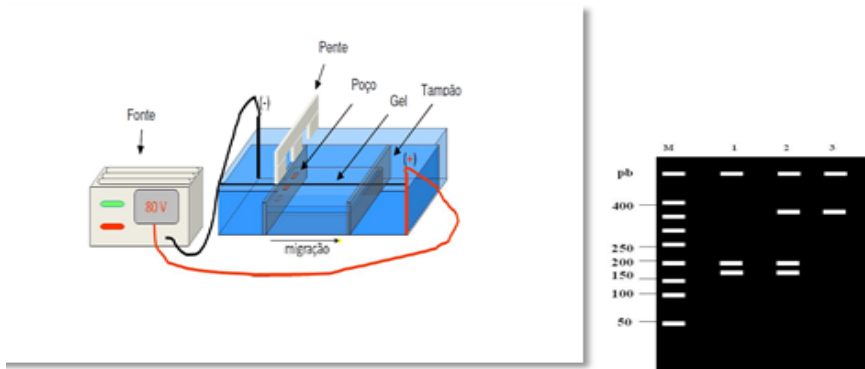
Figura 10 - Representação de eletroforese em gel.
Fonte: CORRÊA; POSSIK, 2016.

PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) é uma inovação tecnológica baseada no princípio da PCR, para multiplicar ácidos nucleicos que vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos do DNA obtido; sendo de grande relevância para diagnósticos de variados patógenos e doenças genéticas (NOVAIS; ALVES, 2004). Dentre outras, a qRT-PCR pode ser aplicada na identificação, quantificação e caracterização genética de diversos vírus, bactérias e fungos (PEREIRA; MACIEL, 2004).

Em tese, a metodologia combina a metodologia da PCR convencional, onde a amplificação do ácido nucleico ocorre em ciclos térmicos que se repetem e utiliza os mesmos reagentes acrescido de fluorocromos (PEREIRA; MACIEL, 2004), moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico para detectar e quantificar o DNA (NOVAIS; ALVES, 2004).

Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR® Green e TaqMan®. O SYBR® Green se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde (Figura 11). Apesar de baixo custo, a desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo (NOVAIS; ALVES, 2004).

TaqMan® é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda possui dois diferentes corantes fluorescentes (Figura 12), um repórter - **R** na extremidade 5’ e um *quencher*- **Q** (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor) na extremidade 3’

(NOVAIS; ALVES, 2004). Quando a sonda está intacta, a energia fluorescente é absorvida pelo *quencher*. Porém, no momento em que a sequência alvo estiver presente, a sonda específica para região alvo da sequência a ser amplificada se anela logo após um dos primers. Durante a fase de extensão da qRT-PCR a sonda Taqman® hibridizada na fita simples de DNA é clivada pela atividade exonuclease 5'-3' da DNA polimerase. Na clivagem da sonda, o reporter já não transfere emissão de energia para o quencher, resultando em aumento da intensidade de fluorescência (HEID et al., 1996). Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial (NOVAIS; ALVES, 2004).

O método de qRT-PCR ocorre em um sistema fechado, uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência (NOVAIS; ALVES, 2004) e é monitorada através de um programa computacional que avalia a evolução da técnica por meio da detecção de fluorescência dos produtos amplificados a cada ciclo (MACKAY; ARDEN; NITSCHE, 2002), devido a adição do fluoróforo (ou fluorocromo) à reação, com isso, conforme a reação progride, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA de fita dupla, que se liga ao corante, resultando em aumento da fluorescência. O número de ciclos necessários para deteccção de emissão de fluorescência é determinado pela quantidade de DNA presente na amostra (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2007).
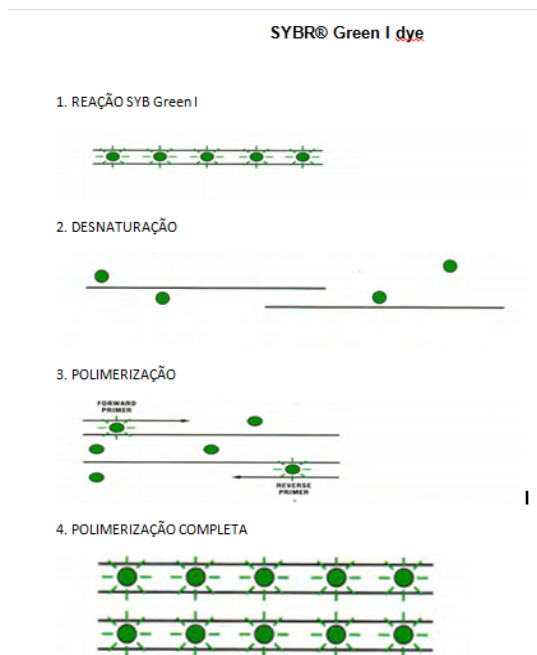
Figura 11 - PCR em Tempo Real com SYB Green®.
Fonte: LEVI, 2009 adaptado.
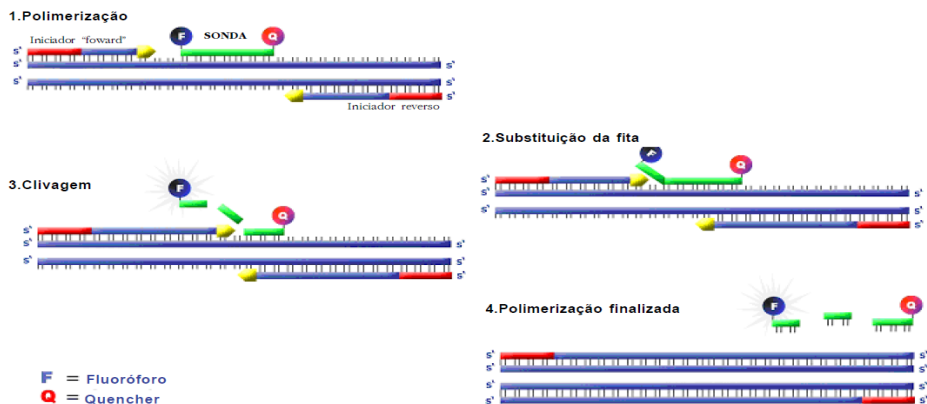
Figura 12 - PCR em Tempo Real com sonda TaqMan®.
Fonte: NOVAIS; ALVES, 2004.

A amplificação é dividida em 3 fases distintas (Figura 13): a linha basal na qual não há produtos suficientes para detectar fluorescência, a fase log ou exponencial em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo; neste ponto é definido o ciclo em que detecta o limiar da fase exponencial denominada de *Cycle threshold* (Ct) (BUSTIN; 2000), e por fim, a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos tendo em vista os componentes da reação tornar-se limitada e a intensidade de fluorescência não ser mais útil para cálculo de dados (WONG; MEDRANO, 2005; LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).
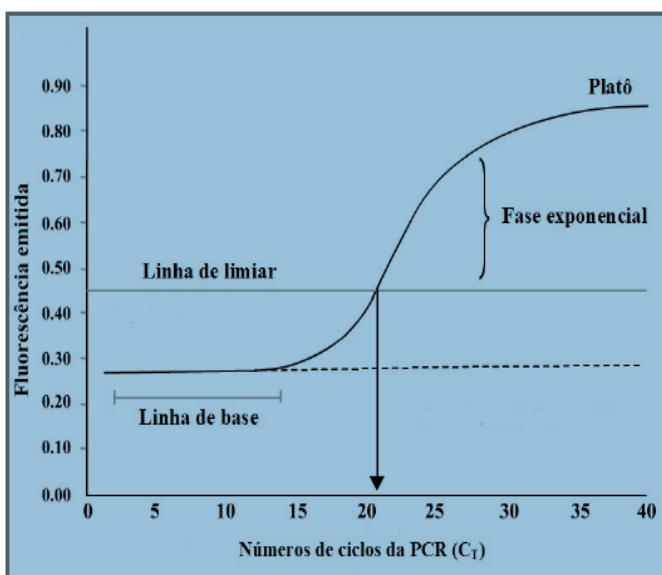
Figura 13 - Curva de amplificação da PCR em Tempo Real. CT- Cycles Thereshold.
Fonte: MOREIRA, 2012.

A técnica trouxe algumas melhorias marcantes em relação à PCR convencional, como o aumento da rapidez e a redução do risco de contaminação laboratorial com produtos amplificados, por não necessitar da manipulação dos amplicons produzidos, além de ser um método mais sensível e eficiente, quando por meio de um experimento bem planejado aplicado com controles adequados (OKINO, 2007; WONG; MEDRANO, 2005). Para melhor validar o procedimento é interessante realizar na qPCR controle negativo, com todos os reagentes, mas sem a amostra de DNA, e, positivo, com cDNA (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização molecular e determinar o perfil clínico do arbovírus CHIKV circulante no estado de Roraima no ano de 2015.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar laboratorialmente por qRT-PCR a presença do CHIKV em amostras de pacientes com diagnóstico presuntivo de CHIK em Roraima;
- Realizar o sequenciamento de um segmento do CHIKV dos casos circulantes no Estado;
- Identificar o genótipo e as características moleculares do CHIKV circulante no Estado;
- Caracterizar os principais sintomas clínicos de pacientes infectados com o CHIKV;

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo seguiu as etapas indicadas no fluxograma (Figura 14). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol) da Universidade Federal de Roraima e uma segunda etapa no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ-Amazônia).
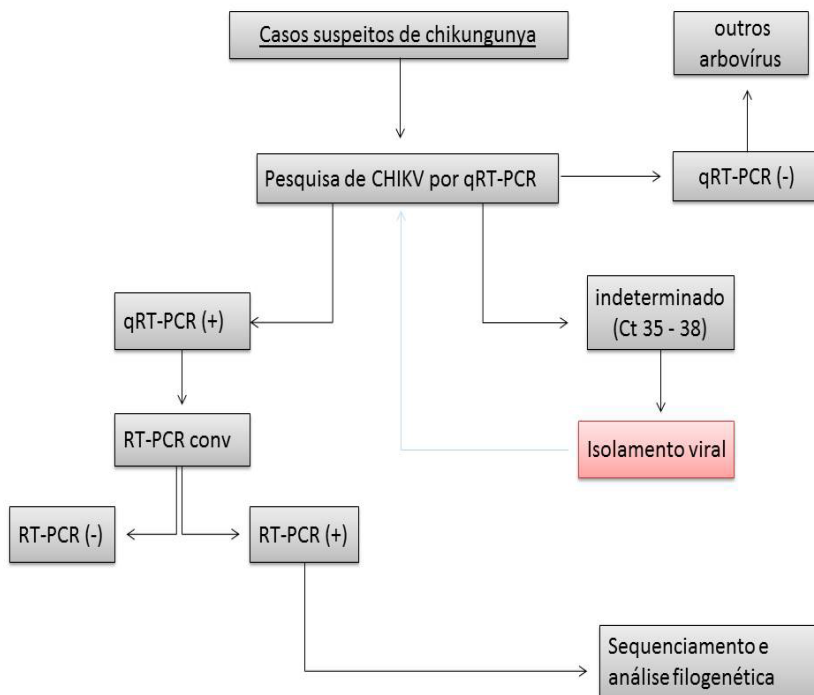
Figura 14 - Fluxograma indicando a metodologia geral da pesquisa.

PRINCÍPIOS ÉTICOS

Este estudo faz parte de um projeto submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima (CEP/UFRR) sob o parecer n° 409.084 (Anexo A).

DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no estado de Roraima, situado no extremo norte brasileiro. O Estado dispõe atualmente de 15 municípios, incluindo sua capital Boa Vista e apresenta uma população de 450.479 habitantes (BRASIL, 2010). O Estado ocupa uma área de 224.298,980 km². Limita-se ao norte com a República Bolivariana da Venezuela e a República Cooperativa da Guiana, ao sul com o estado do Amazonas, a leste com

a República Cooperativa da Guiana e o estado do Pará e a oeste com a República Bolivariana da Venezuela e o estado do Amazonas (Figura 15) (BRASIL, 2009). Essa posição estratégica liga o Brasil até Caracas, Georgetown, partindo de Manaus no estado do Amazonas, tornando um elo entre as relações comerciais internacionais entre Brasil e Venezuela (BRASIL, 2009).

Figura 15 - Mapa do estado de Roraima mostrando os limites estaduais e fronteiras.
Fonte: INTERAIMA (acesso em: 25 de abril 2016).

AMOSTRAGEM

O estabelecimento de parceria entre o Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol) da Universidade Federal de Roraima e o Laboratório Central (LACEN/RR) e ainda o Hospital Geral de Roraima (HGR), tornou possível a obtenção de amostras de soro de pacientes suspeitos de CHIK. As amostras coletadas nas Unidades de Saúde do Estado são enviadas para o LACEN/RR; porém, até final de 2015, por não possuir técnica adequada para pesquisa do vírus, foram selecionadas algumas amostras, conforme critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, e enviadas ao Instituto Evandro Chagas (IEC/PA).

Alíquotas suficientes das amostras de soro foram recolhidas no LACEN/RR e HGR, transportadas sob-refrigeração até o LaBMol, acompanhadas, em sua maioria, das fichas

de notificação compulsória com os dados clínicos. No LaBMol, as amostras receberam uma identificação interna, e em seguida, armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso.

Para o estudo foram analisadas 83 amostras coletadas entre janeiro a dezembro de 2015, que foram submetidas ao teste de qRT-PCR para identificação viral, obtenção do fragmento de 434pb da região nsP1 por RT-PCR convencional e análises filogenéticas e sintomatológicas.

Para análise dos principais sintomas e persistência dos sinais clínicos, foram selecionados os pacientes que possuíam ficha de notificação compulsória devidamente preenchida, passível de leitura e identificação com dados como: nome, endereço, telefone para contato e que relataram experimentar algum (ns) dos principais sintomas como febre repentina acima de 38,5°C, artralgia, ou outro sinal relevante. As fichas foram analisadas quanto à apresentação da sintomatologia e os pacientes foram contatados por telefone para questionamento quanto a sua permissão para participar do estudo e responderem a um questionário com perguntas estruturadas. Aqueles que aceitaram participar do estudo precisaram assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) ou Termo de Assentimento (TA), quando menor, assinado pelos pais ou responsável. O questionário tinha objetivo de analisar a persistência dos sinais da enfermidade nos pacientes acometidos após o período de fase aguda.

Como critério de exclusão ao teste de identificação viral foram descartadas as amostras que não possuíam ficha de notificação ou que não foi possível obtenção desta, ou com quantidades insuficientes de soro para detecção ou submissão de isolamento viral. Da mesma forma, os pacientes que possuíam ficha de notificação sem relato dos sintomas clínicos ou não aceitaram participar do estudo, não foram inclusas na análise sintomatológica.

ISOLAMENTO VIRAL

Nas amostras testadas por qRT-PCR que apresentaram resultado com valor indeterminado (Ct 35-38), foi realizado isolamento do vírus com objetivo de aumentar a carga viral para tornar possível a identificação do vírus na amostra. A técnica seguiu a metodologia desenvolvida por Igarashi (1978).

Células de mosquito *Aedes albopictus* clone C6/36 foram cultivadas em garrafas estéreis de 40 mL contendo 5 mL de meio de cultura Leibovitz's L-15 modificado com L-glutamina (Himedia- Mumbai/India), suplementado com solução de 5% de Triptose Fosfato, 5% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen$_{TM}$ USA), 1mg/mL de Estreptomicina, 1000U/mL- Penicilina (GIBCO- Invitrogen TM USA), 1 mL de antifúngico (Fungizone-5μg/mL) e 10mL de solução de aminoácidos não essenciais 100x (Sigma®). As garrafas foram

incubadas por 7 dias, em estufa BOD a 28°C até a formação da monocamada de células.

Após o período de 7 dias, inoculou-se 20μL das amostras de soro em meio de manutenção L-15, suplementado com 2% de soro Fetal Bovino. As garrafas inoculadas foram incubadas em estufa a 28°C por 10 dias. Durante o período de incubação, as monocamadas celulares foram inspecionadas diariamente em microscópio invertido para detecção de efeito citopático (ECP), caracterizado pela destruição ou alteração morfológica da monocamada de células à medida que o vírus se multiplica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Findado o estágio de inoculação, foi retirado o fluido celular (sobrenadante resultante da inoculação do vírus) por meio mecânico e armazenado em freezer -80°C para posterior realização de extração do RNA seguida dos testes de qRT-PCR para confirmação da infecção celular.

EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

O RNA viral das amostras de soro e fluido celular foram submetidas à extração com o kit QIAamp seguindo as instruções do protocolo do fabricante. Em um tubo de ensaio foram adicionados uma alíquota de 140μL da amostra e 560μL de tampão AVL, contendo carrier RNA (carregador). A mistura foi brevemente agitada em agitador (QL-901,Vortéx, Vertex) e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente para promover lise das partículas virais. Após centrifugação do tubo para remoção de gotas da tampa, a solução foi transferida para uma coluna de membrana de sílica. Centrifugou-se a coluna para retenção do RNA na membrana. Em seguida o RNA foi lavado para remoção de contaminantes residuais utilizando dois tampões de lavagem (AW1 e AW2). Adicionou-se 60μL de tampão AVE (água livre de RNase que contém 0,04% de azida de sódio) para eluir o RNA aderido à membrana. O eluido foi então armazenado em freezer -80°C até o momento do uso.

RT-PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR)

A qRT-PCR foi realizada em etapa única, utilizando-se um par de primers e sondas marcadas com corantes fluorescentes especificas para o CHIKV (Tabela 1).

Primer/Sonda	Sequência	Referência
Primer	CHIKV_FNF 5'- ACAGGTGTATACTCAGGAGGGAAA	NAVECA (dados não publicados)
Primer	CHIKV_FNR 5' - TCGAGTCCATGGCTGTAAAGAG	
Sonda	CHIKV_FNP 5' VIC – ACCCAGTCACTGAACC MGB	

Tabela 1 - Sequência de primers e sonda para CHIKV.
FNF- primer Forward ou sense; FNR- primer reverso; FNP- sonda .
Fonte: Naveca (dados não publicados).

A qRT-PCR foi eleita neste estudo como principal técnica a ser realizada para detecção do CHIKV, seguindo recomendações de PAHO/WHO (2011), por sua maior sensibilidade, rapidez, redução do risco de contaminação laboratorial com os amplicons, capacidade de acompanhamento em tempo real e quantificação, quando comparados com o método convencional de RT-PCR.

A reação de qRT-PCR para identificação do CHIKV foi realizada misturando-se 5μL de amostra de RNA à 9,8μL de Express qPCRSuperMix Universal, 0,4μL de referência passiva Rox (Rox Reference Dye 25μM), 0,6μL de primer sense e 0,6μL de primer reverso (5μM), 0,2μL de sonda (10μM), 2μL de Express One-Step SuperScript (enzima Transcriptase reversa) e quantidade suficiente (q.s.p) para 20μL de H_2O livre de Rnase. As condições de termociclagem da reção foram 50°C por 15 minutos para confecção do cDNA (Transcrição Reversa), 95°C por 2 minutos para ativação da Taq Polimerase; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação do cDNA e 60°C por 1 minuto para anelamento dos primers e extensão da nova fita. Em todas as reações de PCR foram utilizados controles positivos e controles negativos para detecção de possíveis contaminações.

As leituras da fluorescência foram relizadas pelo Sistema de PCR-Tempo Real modelo Step-One da Applied Biosystems. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX.

Na parte exponencial da amplificação foi determinado o ciclo threshold (Ct) ou ciclo limiar (quando sinal de fluorescência emitida pela amostra é significativamente maior que a fluorescência basal). Este valor indica a positividade da amostra e é uma medida relativa da concentração do alvo, menor Ct implica maior concentração inicial da amostra.

Amostra com valor de Ct ≤ 35 foi considerado positivo, valor de Ct entre 35 – 38 foi considerado indeterminado (necessitando ser repetido para confirmação ou descarte) e Ct ≥ 38 ou confirmado na faixa de indeterminado foram consideradas negativas para CHIKV.

Na ocorrência de um resultado positivo em qualquer dos **Controles Negativos** (CN) ou se o **Controle Positivo** (CP) não gerou um resultado positivo, o experimento foi considerado inválido.

RT-PCR CONVENCIONAL - TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA POR UMA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A RT-PCR convencional foi utilizada no estudo principalmente para tornar possível o sequenciamento de nucleotídeos a partir do fragmento resultante de 434pb do genoma viral localizado na região da proteína não estrutural 1 do genoma.

Foram testados um par de primer para CHIKV modificado pelo LabMol-UFRR (Tabela 2) a partir do modelo desenvolvidos por Pfeffer et al., (1997), que utilizaram

oligonucleotídeos da região do gene mais conservada entre os *Alphavírus*, a proteína não estrutural 1- nsP1 e pelo desenho de primers degenerados (PFEFFER et al., 1997).

Em síntese, a confecção do cDNA a partir das amostras de soro/ fluído foi realizada incubando-se 2μL do RNA viral com 0,5μL do primer reverso M_3W- mod (10μM- ver tabela 3) a uma temperatura de 70°C por 5 minutos e imediatamente após, mantido em banho de gelo. Em seguida, acrecentou-se 7,5μL do Mix preparado com 1μL de tampão (10x), 2,2μL de inibidor de RNAse, 0,25μL de MultiScribe Reverse Transiptase (enzima transcriptase reversa), e quantidade suficiente para (q.s.p) 8μL de H_2O livre de RNAse. O microtubo de 0,2mL com a solução foi imediatamente submetido à termociclagem (termociclador modelo PxEThermalCycler, ThermoEltetron Corporation, USA) por 30 minutos a 48°C e inativação a 95°C por 5minutos.

Gênero	Primer / sequência	Região	Frag-mento	Referência
Alphavírus	M2W(+)YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	nsP1	434pb	PFEFFER et al., 1997
	M3W(-)ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	nsP1		
Alpha-Mod	M2W(+)modTAGAGCRTTYTCGCAYCTRGC	nsP1	434pb	Modifica-doLaBMol
	M3W(-)modACATGAACGGGGTTGTRTCRAACCC	nsP1		

Tabela 2 - Sequências dos Primers para CHIKV modificados de Alphavírus.
Pb- pares de base do fragmento amplificado; M_2W- primer sense; M_3W- primer reverso; nsP1- proteína não estrutural; Y = C ou T; S= C ou G; R= A ou G; H= A, C ou T; W= A ou T; N= A, C, G ou T ; K= G ou T; D= A, G ou T.
Fonte: (NASCIMENTO et al., 2015)

O cDNA resultante da Transcrição reversa foi submetido a uma PCR, onde foi usada uma alíquota de 2,5μL do cDNA misturado ao MIX-PCR contendo 5μL de tampão (5X), 0,95μL de MgCl2 (íon Cloreto de magnésio 25mM), 0,5μL de dNTPs (10mM), 1μL de primer senso e 1μL de primer reverso (ambos 10μM), 0,5μL de Kappa Taq HotStar DNA Pol (Enzima Taq DNA Polimerase- 5U/μL) e quantidade suficiente para (q.s.p) 25μL de H_2O livre de RNAse. Essa solução foi então submetida à termociclagem (termociclador PxE ThermalCycler, ThermoEltetron Corporation, USA) correspondente a uma desnaturação inicial de 95°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos térmicos para desnaturação da fita de cDNA a 95°C por 30 segundos e anelamento dos primers em 54°C por 30 segundos, uma etapa de extensão a 72°C por 45 segundos seguida de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Em todas as reações de PCR foram utilizados controles positivos e controles negativos para detecção de possívieis contaminações. O resultado final da PCR foi a obtenção de amplicons de 434pb, analisadas em eletroforese. Os amplicons foram armazenados em freezer -20°C até o momento do uso.

Eletroforese- Análise dos fragmentos de DNA

Finalizados os ciclos térmicos, 10μL do amplicon assim como 2,5μL de padrão 100pb de comparação misturados a 0,3μL de Azul de Bromofenol, foram submetidos a corrida eletroforética a 90V por 35 minutos inseridos em seus respectivos poços produzidos com a polimerização do gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris+Borato+EDTA) 0,5X. Após a corrida, o gel foi corado em banho de GelRed® (diluição de 15μL de GelRed em 50mL de H_2O destilada) por 25 minutos em agitador (VDRL Shaker TS-2000A; Biomixer) ao abrigo da luz. O produto amplificado foi visualizado e analisado através do fotodocumentador com luz ultravioleta (modelo MiniBis Pro, BioImaging Systems, Uniscience). O tamanho dos fragmentos de 434pb de CHIKV foram determinados pela comparação com o marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder, Ludwig Biotec).

SEQUENCIAMENTO

Para a análise filogenética e identificação do genótipo do CHIKV foi realizado o sequenciamento da região altamente conservada entre os *Alphavírus* que codifica para a proteína não estrutural 1 (nsP1) do genoma viral, usando os mesmos primers da região amplificada na RT-PCR convencional (Tabela 3). As amostras passaram por um processo prévio de purificação e quantificação. O procedimento foi realizado no Centro de Pesquisas do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ- Amazônia).

Gênero	Primer / Sequência	Região	Frag-mento	Referência
Alpha-Mod	M_2W(+)modTAGAGCRTTYTCGCAYCTRGC	nsP1	434Pb	Modificado LaBMol
	M_3W(-)modACATGAACGGGGTTGTRTCRAACCC			

Tabela 3 - Primers usadas para sequenciamento da região de interesse.
M_2W- primer ou iniciador Forward Sense; M_3W- primer ou iniciador reverso; nsP1- proteína não estrutural do genoma viral; 434Pb- tamanho do gragmento da região do genoma escolhida.
Fonte: (NASCIMENTO et al., 2015)

Purificação e quantificação do produto de PCR

O produto amplificado na PCR (amplicons) foi purificado pela precipitação com Polietilenoglicol (PEG) 20%, seguindo as instruções do protocolo (Anexo B) utilizado na plataforma de genômica do Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane- FIOCRUZ- AM. O volume total do produto amplificado foi transferido para um tubo de 1,5mL identificado com a numeração da amostra e foi adicionado volume de PEG 20% na proporção 1:1 (correspondente ao mesmo volume da amostra). A mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos e incubada a 37°C por 15 minutos, procedida de uma centrifugação a 6000 RPM por 15 minutos e, imediatamente, descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 125μL de álcool 80% gelado seguido de centrifugação a 4500 RPM por 2 minutos. Novamente

descartou-se o sobrenadante e o tubo foi incubado com tampa aberta num aquecedor a 37°C por 15 minutos para evaporação do resíduo de álcool. Por fim, adicionou-se ao tubo o mesmo volume inicial do produto de PCR de H_2O livre RNAse homegeneizando com a ponteira para reidratar o pelete formado. Posteriormente, cada produto purificado foi quantificado em espectofotometro (ASP- 37000, ATCGene, USA) em comprimentos de onda de 260 a 280 nm.

Reação de sequenciamento

O sequenciamento descrito corresponde ao método de interrupção da cadeia automatizado, idealizado por SANGER; NICKEN; COULSON (1977). As reações foram realizadas usando kit BigDye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems™, USA). Cada amostra foi submetida a duas reações de sequenciamento para cada iniciador (1 reação para o primer sense e 1 reação para o primer reverso).

Para cada uma das reações foi utilizado 2µL de amostra, 0,5µL de BigDye® (*Master mix que contém os demais componentes necessários na reação: ddNTP, DNT e Taq Polimerase)*, 2µL de primer M_2W-mod e M_3W-mod (3,2µM) por reação, 2µL de tampão 5X e H_2O livre de RNAse para um volume final de 10µL em placa de 96 poços. A placa foi submetida à termociclagem para amplificação como pode ser observado no Quadro 2:

N°Ciclos	Programação
	96°C por 60 segundos
17 Ciclos	
	96°C por 10 segundos
	50°C por 5 segundos
	60°C por 75 segundos
7 Ciclos	
	96°C por 10 segundos
	50°C por 5 segundos
	60°C por 90 segundos
6 Ciclos	
	96°C por 10 segundos
	50°C por 5 segundos
	60°C por 120 segundos
	4°C hold

Quadro 2 - Programa de amplificação da reação de sequenciamento.
Fonte: Plataforma de Genômica- Fiocruz- Amazônia (2015).

O produto final das reações foi purificado pela precipitação com 25µL de EtOH (100%) gelado e 2µL de uma solução em quantidades iguais de EDTA (125mM) e acetato de sódio (3M com pH 5,2). A reação seguiu o protocolo (Anexo C) modificado do kit

BigDye® versão 3.1 (Applied Biosystems™, USA). A placa foi armazenada ao abrigo da luz em refrigerador até o momento do uso. Posteriormente os produtos foram analisados em sequenciador automático modelo ABI 3130 (AppliedBiosystemsTM, USA).

Análise e alinhamento das sequências

As duas sequências parciais de cada amostra foram visualizadas, analisadas, editadas e combinadas para obter uma sequência consenso, usando o programa Geneious versão 9.0.2 (KEARSE et al., 2012), que também foi utilizado para avaliar a qualidade das sequências obtidas, através da análise do cromatograma, retirando-se regiões da sequência com mais de 5% de possibilidade de erro. O valor de QV (do inglês - Quality Value), indica a qualidade das sequências obtidas, sendo que sequências de boa qualidade devem apresentar QV > 20.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas a uma pesquisa pela ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) para confirmação da identidade específica do vírus em comparação com os quatro genótipos de CHIKV disponíveis em bancos de dados. Com a confirmação das sequências, foi montado um banco de dados com sequências de CHIKV dos genótipos: Asiático, ECSA, WA e IOL disponíveis no GenBank. Uma vez identificado o vírus, as sequências foram alinhadas e editadas no programa Geneious versão 9.0.2 (KEARSE et al., 2012).

As sequências obtidas no estudo foram depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Análises Filogenéticas

Para análise filogenética, foram utilizadas 58 sequências com representantes de cepas dos quatro genótipos de CHIKV para comparação com as cinco sequências nucleotídicas de Roraima, sendo (27) Asiático, (10) ECSA, (10) WA e (11) do genótipo IOL e um grupo externo, incluindo cepas representativas mundialmente e de outros estados brasileiros, isolados durante 1953- 2015. Todas as cepas referência foram obtidas a partir do banco de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

As sequências alinhadas foram submetidas a teste de verificação do melhor modelo de substituição nucleotídica por meio do programa MEGA v. 6.0 (TAMURA et al., 2013), sendo apontado o modelo Kimura 2 parâmetros. A reconstrução filogenética foi realizada pelos métodos Neighbor-Joinning (NJ) usando o programa Geneious utilizando parâmetros otimizados para o conjunto de dados e aplicando-se um valor de 1000 pseudo-réplicas (bootstrap).

ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE CHIKUNGUNYA

A avaliação sintomatológica de “chikungunya” compreendeu a análise dos sinais e sintomas clínicos relatados pelos pacientes durante atendimento na Unidade de Saúde recolhida pelo profissional em ficha de notificação compulsória. Além da ficha, foi aplicado um questionário com perguntas objetivas (anexo D) para capturar dados que permitissem a avaliação da persistência dos sintomas como relatados em literatura.

Foram selecionados os casos confirmados de chikungunya com as fichas de notificação devidamente preenchidas. Os que não se encaixaram, segundo os critérios necessários, ou não aceitaram participar da pesquisa, foram descartados do estudo para análise das características clínicas e da persistência sintomatológica.

Os pacientes foram contatados para questionamento quanto a sua permissão de participação. Aqueles que aceitaram participar precisaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou Termo de Assentimento (TA), quando menor, assinado pelos pais ou responsável.

O questionário apresentado com objetivo de analisar a persistência dos sintomas e comparar o relatado na ficha de notificação constava de perguntas diretas como: sintomas apresentado, membro do corpo em que houve dor articular, uso de medicação, tempo de duração de dor articular, recorrência de dores articulares ou de outros sintomas não apresentados na fase aguda.

As fichas de notificação clínica, assim como as respostas dos questionários foram analisadas para captura da história clínica relatada. Os dados foram inseridos em planilha no programa Microsoft Excel (versão 2010).

Para identificação dos sintomas mais frequentes e a persistência dos sinais entre os casos positivos para CHIKV, foi realizado estatística descritiva dos sintomas usando o programa Microsoft Excel (versão 2010). O Test- t para duas amostras foi realizado para comparar a média de sintomas apresentado entre os grupos masculino e feminino realizado no programa R (versão 3.1.2), considerando como valor de significância $p<0,05$.

Para analisar a existência de evidências de associação entre variáveis qualitativas foi aplicado o teste X^2 (qui-quadrado) usando o programa Microsoft Excel (versão 2010), considerando $p< 0,05$ como valor de significância.

OBTENÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA CHIKV POR QRT-PCR

Durante o período de janeiro a dezembro de 2015 foram testadas 83 amostras diagnóstico presuntivo para chikungunya. Destas amostras, apresentaram positividade em 29 soros e 02 fluidos celulares após isolamento viral, representando um total de 31 amostras positivas (n=31), equivalente a 37,34% das amostras analisadas (Figura 16).
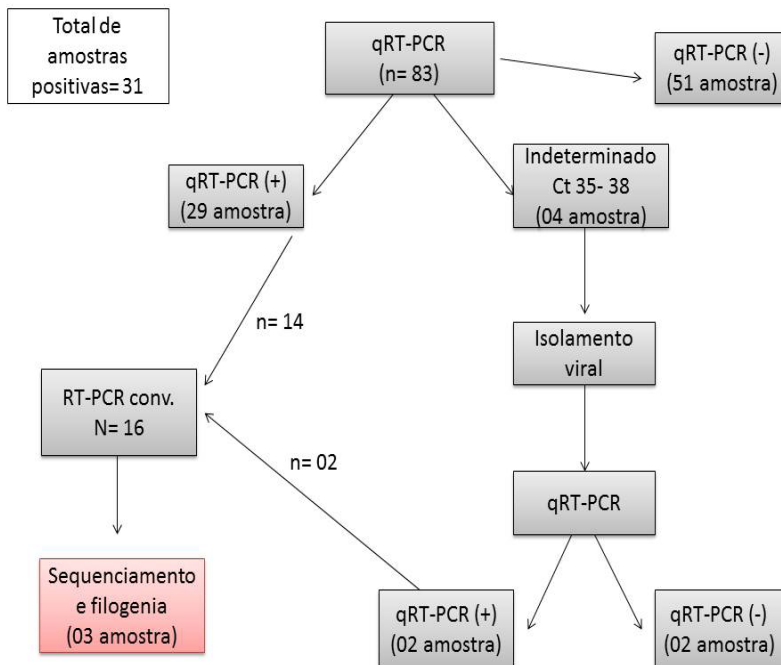
Figura 16 - Fluxograma do resultado obtido na pesquisa.

O ensaio de qRT-PCR foi realizado com a utilização dos primers sense – FNF 5'; reverso- FNR 5' e sonda Taqman- FNP 5'VIC. Neste ensaio foram testadas diretamente com positividade 29 amostras. Foi realizado isolamento viral de 04 amostras que apresentaram valor de Ct indeterminado, com objetivo de aumentar a carga viral na amostra, das quais em 02 amostras apresentaram positividade a um novo teste de qRT-PCR, sendo 15/018RR e 15/116RR com valor de Ct 16 e 14 respectivamente que posteriormente foram submetidas ao ensaio de RT-PCR convencional onde foram utilizados os primers sense M_2W-mod e reverso M_3W-mod.

O resultado da qRT-PCR foi possível ser acompanhado em tempo real através do

desenho de um gráfico. O Cycle Thereshold- Ct que determina o ponto em que a reação atinge a fase exponencial, indicando uma medida relativa de concentração (eixo horizontal do gráfico da figura 17). Quanto menor a quantidade de ciclos necessários para a detecção do alvo, maior a concentração de DNA presente na amostra (NOVAIS; ALVES, 2004). As amostras que apresentaram resultado negativo para CHIKV serão alvos de pesquisas para outros arbovírus.
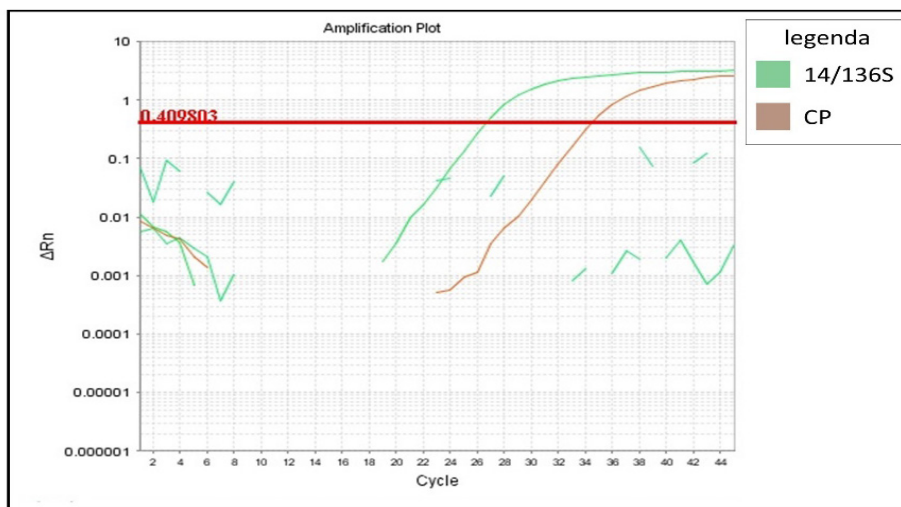
Figura 17 - Curva de amplificação de amostras do CHIKV detectado por qRT-PCR.
Observação: O gráfico mostra a curva de amplificação de uma amostra positiva (verde) ; o Controle Positivo, (marron) e Linha de corte ou basal (vermelho).

Todas as amostras submetidas à reação de RT-PCR convencional, geraram um fragmento de 434pb na região do genoma viral que codifica para a proteína nsP1. A visualização dos fragmentos foi possível pela submissão das amostras por eletroforese em gel de agarose corado em banho de GelRed® e fotografado e analisado por fotodocumentador com luz ultravioleta (Figura 18).
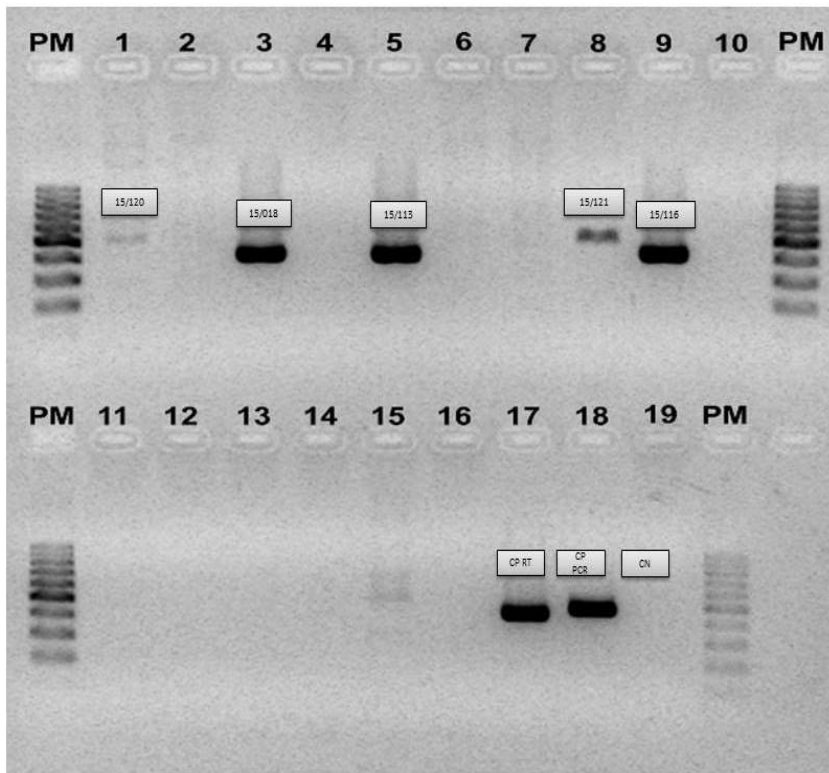
Figura 18 - Observação por eletroforese dos produtos amplificados de amostras de CHIKV por RT-PCR.
(PM) Marcador de peso molecular de 100 pb; (1,3, 5, 8, 9) amostras positivas de CHIKV 434pb; (2, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) Amostras Negativas pra CHIKV; (17) Controle Positivo de RT; (18) Controle Positivo de PCR; (19) Controle Negativo de PCR.

SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA PROTEÍNA NSP1

Após a obtenção dos fragmentos de 434pb pela RT-PCR convencional 03 amostras gerando duas sequências parciais para cada amostra, sendo uma para o primer sense M_2W-mod e uma para o primer reverso M_3W-mod. As regiões inicial e final de cada sequência precisaram ser eliminadas por obter baixa qualidade nos picos e grande quantidade de ruídos (Figura 19). Com esse procedimento trabalhou-se apenas com a região com pico de boa qualidade que foram editadas e a partir daí montada uma sequência consenso (Figura 20), com as sequências parciais. As sequências obtidas foram cortadas visando manter o máximo de nucleotídeos alinhados da região amplificada da proteína não estrutural nsP1, que é de 1608 pares de bases, resultando em um fragmento final de 354 pares de base. As sequências genômicas finais codificam 118 aminoácidos da proteína nsP1.
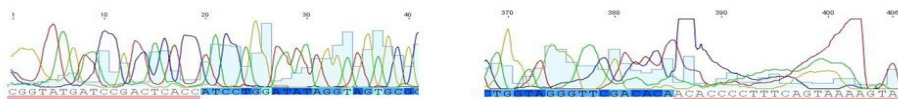
Figura 19 - Regiões inicial e final da sequência de nucleotídeos da amostra 15/116 de CHIKV eliminadas na análise do cromatograma.
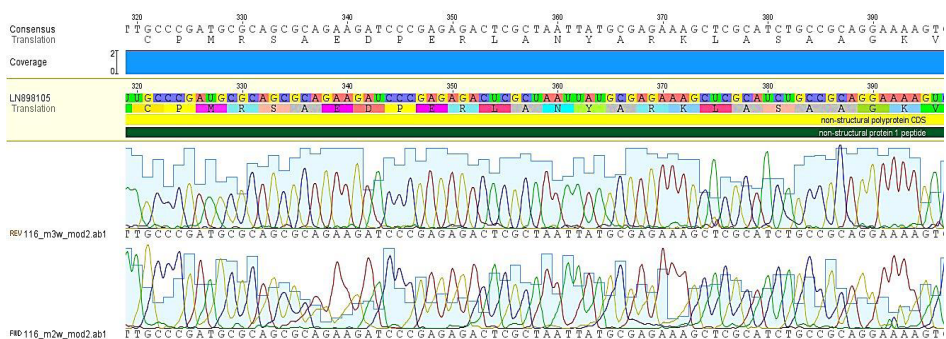
Figura 20 - Cromatograma da sequência consenso da amostra 15/116RR de CHIKV

As sequências geradas foram depositadas no GenBank e podem ser localizadas a partir do número de acesso de cada amostra: 15/18- (KX394253); 15/113RR-(KX394254); 15/116RR- (KX394255) (anexo E).

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL NSP1 DO GENOMA DO CHIKV

As sequências de nucleotídeos resultantes de cada amostra, foram submetidas a uma análise pela ferramenta BLAST inserida no pacote do Softwere Genious 9.0.2 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), que indicou que as três sequências obtidas de amostra de CHIKV em Roraima para o estudo apresentaram uma similaridade que variou de 99,4 a 100% em relação a outras cepas de CHIKV do genótipo Asiático depositadas no Genbank a nível mundial (Quadro 3).

PAÍS	Número de acesso	15/18RR	15/113RR	15/116RR
BR- Pará	KP164572	100%	100%	99,7%
BR- Paraíba	KP164571	100%	100%	99,7%
BR- Amapá	KP164567	99,7%	99,7%	99,4%
México	KT327163	100%	100%	99,7%
Colômbia	KR559491	100%	100%	99,7%
Ilhas Virgens Britânicas	KJ451624	100%	100%	99,7%
Guiana Iglesa	KR559496	100%	100%	99,7%
Honduras	KR559487	100%	100%	99,7%
Malásia	EU703759	99,7%	99,7%	99,4%
Martinica	LN898093	100%	100%	99,7%

Quadro 3 - Relação de similaridade das sequências de nucleotídeos de CHIKV obtidas em Roraima de janeiro a dezembro de 2015 com outras sequências do genótipo Asiático depositadas no GenBank.

É perceptível a alta similaridade entre as amostras de CHIKV obtidas no estado de Roraima em relação a outras amostras a nível mundial assim como de outros estados brasileiros como Pará e Paraíba, além daquelas relacionadas ao país de fronteira Guiana Inglesa. A cepa Asiática identificada no Amapá-BR (KP164567) não apresentou o mesmo grau de similaridade com as nossas amostras.

Por outro lado, a similaridade entre as amostras estudadas e as cepas de Roraima de casos importados isoladas por Acosta et al. (2015) apresentou grau elevado e semelhante correspondendo a 99,7 -100%, (Quadro 4.) podendo sugerir que a introdução no Estado não foi oriunda de outros estados brasileiros; ressalta-se ainda para reforçar a sugestão, que das cepas isoladas em outros Estados, apenas a do Amapá (KP164567) corresponde a um caso autóctone, sendo a que apresentou maior divergência entre nossas amostras. Apesar de não ser possível inferir a rota do CHIKV em Roraima, a impressionante semelhança das amostras isoladas no Estado de casos autóctones para este estudo (15/18RR, 15/116RR) e as provenientes da Venezuela (14/106RR, 14/113RR) estudadas por Acosta et al. (2015) e a do nosso estudo igualmente importda (15/113RR), sugere uma origem comun que poderia indicar uma possível introdução a partir desse país. Todavia, apesar de não ser possível apresentar a caracterização de uma cepa proveniente da Guiana inglesa, dado a aproximação geográfica do estado de Roraima com este país, com movimentação constante de brasileiros que se deslocam com objetivos principalmente comerciais, e a similaridade elevada entre as cepas estudadas, não se pode deixar de considerar a possibilidade de entrada por esta rota.

Roraima	Número de acesso	14/106RR	14/113RR	15/18RR	15/113RR	15/116RR	A/I
14/106RR	KX394251	-	100%	100%	100%	99,7%	I
14/113RR	KX394252	100%	-	100%	100%	99,7%	I
15/18RR	KX394253	100%	100%	-	100%	99,7%	A
15/113RR	KX394254	100%	100%	100%	-	99,7%	I
15/116RR	KX394255	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	-	A

Quadro 4 - Relação de similaridade das sequências nucleotídicas entre as cepas identificadas em Roraima de casos autóctones e não autóctones.
A- autóctone, I- importado.

As três sequências obtidas da região da proteína não estrutural nsP1 foram comparadas com 58 sequências representativas dos quatro genótipos de CHIKV (Asiático, ECSA, WA e IOL), depositadas no Genbank a nível mundial, incluindo países das Américas (anexo F). Posteriormente, as sequências foram alinhadas e editadas. As análises filogenéticas foram feitas pelo método Neighbor-Joinning (NJ), sendo que o melhor modelo de substituição de nucleotídeos escolhido foi o Kimura 2 parâmetros.

A árvore filogenética (Figura 21) foi construída usando o programa Geneious versão 9.0.2. A confiabilidade dos grupamentos filogenéticos ou dos ramos da árvore foi apoiada usando análise de Bootstrap com 1000 pseudo-réplicas. Para permitir o enraizamento da árvore foi utilizada uma cepa do *Alphavírus* O'nyong-nyong (ONNV) como grupo externo, para permitir de maneira mais realista as relações entre as sequências. A sequência de ONNV encontra-se disponível no banco de dados do Genbank (número de acesso AF079456).

A análise filogenética das três sequências obtidas confirmou o genótipo Asiático, pois formaram juntamente com as amostras referência depositadas no banco de dados do Genbank, pertencentes ao genótipo Asiático e ainda com as 02 cepas de Roraima (KX394251, KX394252) identificada anteriormente por Acosta et al. (2015) um grupo separado dentro do genótipo Asiático com suporte de Bootstrap de 64,1%, sendo o ideal aceitável acima de 50%. Podendo ainda esta afirmação ser amparada pelo grau de similaridade correspondente entre as amostras estudadas e as cepas referência escolhidas no banco de dados do Genbank. O valor de Bootstrap baixo pode ser devido ao tamanho da amostra estudada. As cepas de Roraima se agruparam em um único subclado junto à linhagem americana, sugerindo uma possível relação genética entre elas, sendo confirmada ainda pela relação de similaridade de 99,7 - 100% entre as mesmas.
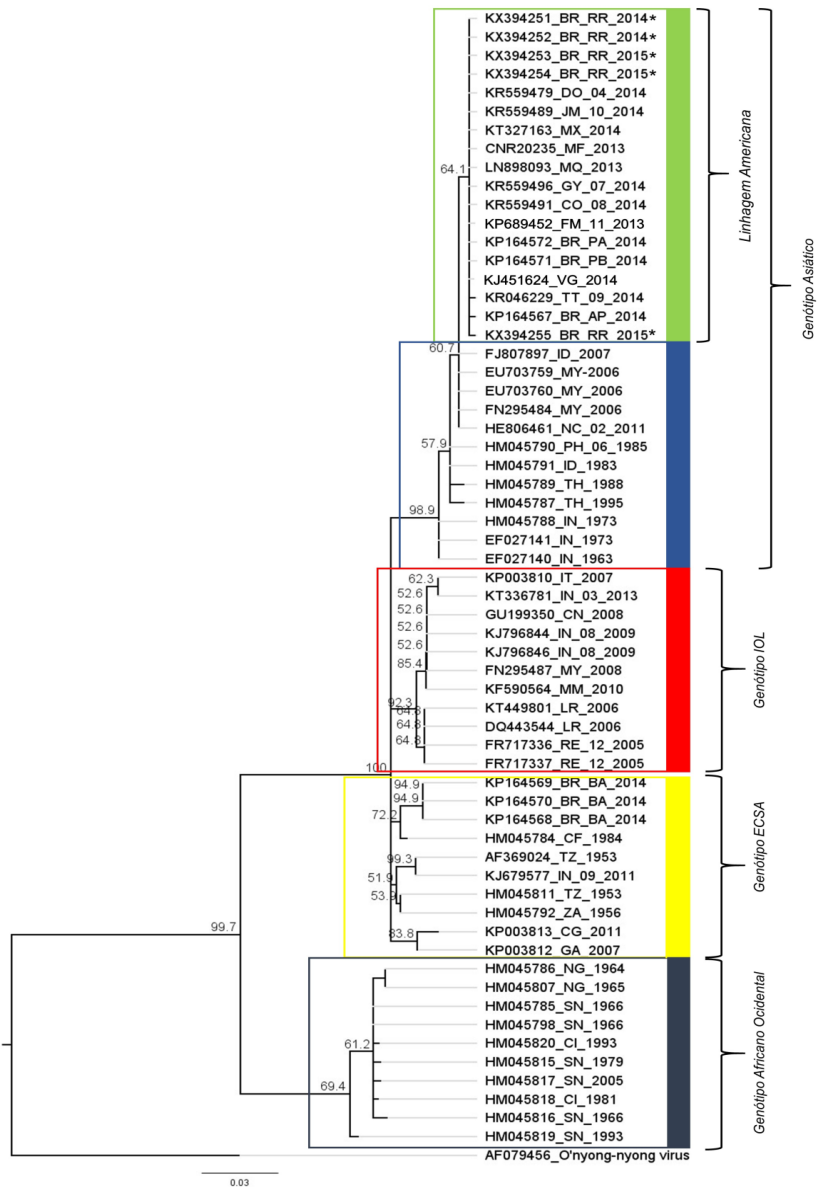
Figura 21- Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joinning usando as 03 cepas de CHIKV deste estudo, as do estudo de Acosta et al., (2015), ambas isoladas em Roraima e representantes dos 04 genótipos a nível mundial.
BR- Brasil, DO- República Dominicana, JM- Jamaica, MX- México, MF- San Martim, MQ- Martinica, GY- Guiana, CO- Colômbia, MF- Micronésia, VG- Ilhas Virgens Britânica, TT- Trinidad, *Amostras do estudo.

A região do genoma escolhida no estudo baseou-se na proteína não estrutural nsP1 que possui 1608 nucleotídeos que codificam 535 aminoácidos dos quais 17 (Q31-VTPNDHANARAFSHLA- 47) são conservados entre os *Alphavírus* presentes na posição 31 a 47 da proteína (KHAN et al., 2002). Das 03 amostas sequenciadas, duas apresentaram

entre si homogeneinade na conservação de nucleotídeos (15/18RR, 15/113RR). No entanto, na amostra 15/116RR foi possível observar três substituições de nucleotídeos por transição na posição 333 C→T, 351 C→T e 369 G→A, além de uma única substituição por transversão (Figura 22) na posição 340 sendo de A→T. Este resultado reafirma a observação de Powers et al., (2000), de que o genótipo Asiático demonstra um vírus com sequências nucleotídicas altamente conservadas com divergência de menos de 3% entre as estirpes ao longo de 35 anos. Ao comparar o genótipo Asiático com isolados de diferentes períodos (1963 e 1973), Arankalle et al. (2007) observaram alta identidade entre elas, sendo 99,72% na região da proteína não estrutural e 99,44% na proteína estrutural. Além desse fator, a região da proteína nsP1 é conhecida entre os *Alphavírus* por ser uma região conservada.
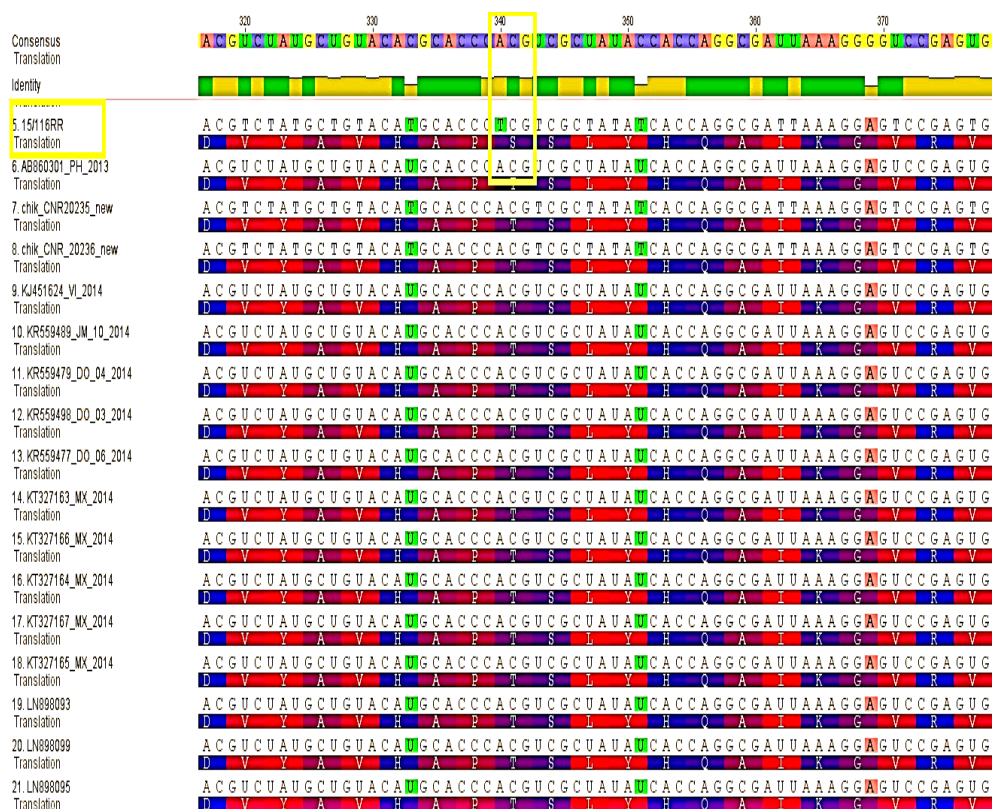
Figura 22 – Sítio de Variação de nucleotídeo entre as sequências analisadas.

A substituição de nucleotídeos por transversão identificada resultou em troca de aminoácidos residuais T118S (Thr → Ser). Essa alteração, no entanto, implica em aminoácidos com características bioquimicamente semelhantes, pois tanto a Treonina quanto a Serina possuem característica polar, hidrofílica, com função alcóolica (ambos

são hidroxilados) (Figura 23). Esses dados indicam que as cepas de CHIKV isolados em Roraima apresentam aminoácidos altamente conservados com apenas uma substituição com troca de aminoácidos provavelmente sem grande implicação bioquímica. Todavia, não é possível afirmar se essa alteração pode ter influenciado no perfil virêmico do vírus. No sequenciamento completo por nova geração, Stapleford et al., (2016), ao estudar as cepas de Guadalupe e Martinica, apesar de identificar maior grau de divergência na região da proteína nsP3, também observou cinco substituições por transição e seis por transversão, resultando em oito trocas de aminoácidos na proteína nsP1 e três substituições sinônimas, entretanto, de baixa frequência < 1%. Outros estudos, também observaram baixa frequência de troca de aminoácidos na região da proteína nsP1, como Schuffenecker et al. (2006) que observaram apenas uma alteração, sendo Treonina para Isoleucina (T301I). Sahadeo et al. (2015) identificaram em apenas uma amostra 1,1% de substituição de nucleotídio de A→T, todavia resultando em troca sinônima de aminoácidos, pois ambos codificam Leucina (Leu) na posição 384 de nsP1. Ainda assim, é importante salientar que a análise do presente estudo baseou-se em uma sequência parcial do gene e que estudos mais detalhados do genoma viral fazem-se necessários para um melhor entendimento sobre o vírus.

Treonina (Thr/T)

Serina (Ser/S)
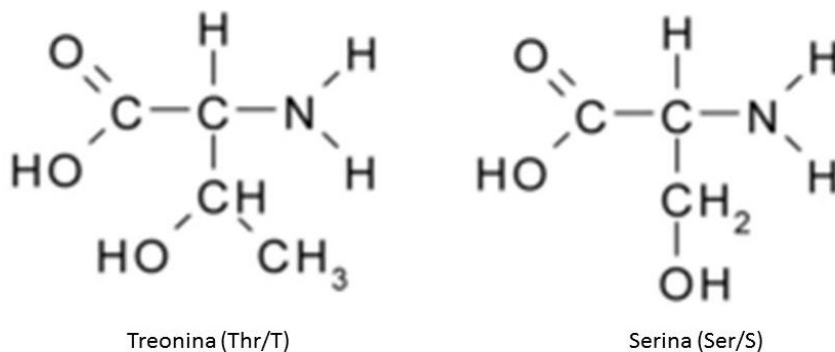
Figura 23 - Similaridade entre as estruturas dos aminoácidos Treonina e Serina.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS APRESENTADAS PELO VÍRUS CIRCULANTE EM RORAIMA

Das 31 amostras positivas, em 02 não foi possível identificar as fichas de notificação e 06 tiveram ficha com dados incompletos sem informação sintomatológica. Todavia, foram selecionados 23 pacientes para análise dos sintomas clínicos decorrentes da infecção por CHIKV com fichas de notificação devidamente preenchidas. Os pacientes eram de ambos os sexos com idade entre 15 - 56 anos.

Neste estudo, ocorreu prevalência de pacientes do sexo feminino (65%) em

relação ao masculino (35%), assim como houve uma pequena prevalência de sintomas gerais apresentados entre mulheres (até 10 sintomas contra 8 dos homens), embora não estatisticamente significante (p> 0,05). Ao comparar a variável entre sexo e sintomas, houve uma pequena influência do sexo envolvida com dor nas costas, sendo mais frequente entre homens com valor de significância de 0,045 (p 0,045). O fato de o grupo feminino ser maior no estudo pode ter ocorrido devido maior procura do serviço de saúde por mulheres. Embora outros estudos também demostrem maior prevalência entre indivíduos do sexo feminino, tais como Rezza et al. (2007) com 52% de pacientes do sexo feminino e 48% do sexo masculino e García et al. (2015) com 65% mulheres e 35% homens concordando com o achado no estudo.

Os sintomas mais frequentes apresentados foram febre (100%), cefaleia (95,7%), artralgia (73,9%) e mialgia (65,2%). Os parâmetros clínicos gerais observados neste estudo encontram-se relacionados na Tabela 4. Os dados são condizentes com o relatado por Rezza et al. (2007) e García et al. (2015), que estudaram a relação entre os sintomas de chikungunya e dengue e encontrou frequência de sintomas clínicos semelhante aos encontrados neste trabalho, com especificidade de artralgia para chikungunya localizada nas extremidades. Em todos os pacientes existiu a prevalência de 100% de febre, seguido de cefaleia, artralgia e mialgia. Ainda assim, não se pode afirmar que existe a possibilidade de concluir o diagnóstico de chikungunya clinicamente pelos sintomas, visto que outras arboviroses também podem apresentar quadro semelhante, muito embora exista em grande maioria a presença marcante de febre e artralgia na infecção por CHIKV. Entre os outros sintomas (77,7%) dos pacientes estudados relataram apresentar dor nos olhos e nenhum relatou sangramento. Todos os pacientes fizeram uso de algum medicamento analgésico, antipirético ou anti-inflamatório.

Sintomas	F (n)	%F	M(n)	%M	Soma total	% Total
Febre	15	100,0	8	100,0	23	100,0%
Cefaleia	14	93,3	8	100,0	22	95,7%
Artralgia	12	80,0	5	62,5	17	73,9%
Mialgia	8	53,3	7	87,5	15	65,2%
Exantema	10	66,7	4	50,0	14	60,9%
Náusea	8	53,3	4	50,0	12	52,2%
Dor nas costas	6	40,0	6	75,0	12	52,2%
Edema	9	60,0	2	25,0	11	47,8%
Vômito	4	26,7	2	25,0	6	26,0%
Conjuntivite	3	20,0	2	25,0	5	21,7%
Calafrio	1	6,7	1	12,5	2	8,7%

Tabela 4 - Sintomas clínicos apresentados na infecção por chikungunya.

Dentre os pacientes que apresentaram artralgia a distribuição da dor se localizou principalmente nas articulações das mãos (88%), dedos dos pés (77%), punhos (55%) e joelhos (44%), com duração de 3-10 dias, sendo que (77%) dos pacientes afirmaram que a dor incapacitou de realizar suas atividades diárias. A localização da dor articular concorda com o estudo de Soumahoro et al. (2009). Apenas 33,3% dos pacientes afirmaram que as dores articulares voltaram a ocorrer em uma média de tempo de 45 dias; e igualmente 33,3% pacientes relataram que após 03 meses do tratamento inicial, perceberam outros sintomas além da artralgia como: artrite, dor nos ossos, cansaço e fraqueza, além de um paciente relatar sinais de depressão. O estudo de Seijo et al., (2014) relata recorrência de dor articular, em geral nos mesmos locais apresentados na fase aguda, além de outros sintomas como depressão, relatada por Soumahoro et al. (2009). Ainda assim, não é possível afirmar estreito relacionamento desses sintomas com o vírus, visto que outros fatores poderiam estar colaborando para o estabelecimento desses sinais clínicos.

Todavia, não se pode deixar de considerar que a artralgia, embora não tenha sido relatada por 100% dos pacientes, foi frequente em uma proporção considerável (73,9%), assim como nos estudos de García et al. (2015) e como em Soumahoro et al. (2009), que demonstraram que a artralgia esteve presente com maior intensidade entre os pacientes com chikungunya. Da mesma forma, Borgherini et al. (2007), que além da prevalência ainda consideraram que este sintoma é particularmente importante no diagnóstico clínico diferencial com dengue em lugares onde circulam as duas arboviroses. Vale ressaltar que no primeiro relato sobre chikunkunya realizada por Robinson (1955), a dor nas articulações foi fator marcante, grave e assustador que incapacitava os acometidos. Entretanto, neste estudo, a análise foi baseada em uma amostra pequena (n=23) para as características clínicas do vírus circulante no Estado. Portanto, considera-se interessante que outros estudos sejam realizados para melhor elucidar as características clínicas da infecção, e que provavelmente, possa colaborar no diagnóstico clínico. Todavia, a realização de testes laboratoriais rápidos e sensíveis é essencial para o encerramento do diagnóstico diferencial entre chikungunya e as demais arboviroses que circulam em conjunto no Estado e para tomada de decisão da conduta terapêutica.

Desde a confirmação da presença do CHIKV em Roraima, os casos notificados só aumentaram passando de 200 casos em 2014 para 455 casos em 2015. Trata-se de um cenário preocupante, considerando que além de CHIKV, o Estado coleciona outros arbovírus como os quatros sorotipos de Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), e mais recentemente ZIKV, circulando simultaneamente e disputando o mesmo mosquito vetor, *A. aegipty*, além da presença de MAYV (veiculado por *Haemagogus janthinomys)*, OROV (veiculados por *Culicoides paraenses),* podendo incidir para possível epidemia em grandes

proporções que poderia aumentar a procura pelos serviços de saúde de emergência e que pela falta de um método laboratorial específico poderia incorrer para conflito de diagnóstico. Uma vez que esses arbovírus circulam simultaneamente no estado de Roraima, é razoável considerar a existência de co-infecção em um mesmo indivíduo, como já foi relatado por Leroy et al. (2009), a presença de DENV-2 e CHIKV simultaneamente entre suas amostras no surto de Gabon, país africano.

Diante dos relatos e da falta de imunização específica para prevenção de chikungunya, a melhor maneira de enfrentar a emergência ou a re-emergência de CHIKV e dos demais arbovírus, em circulação, ainda reside na articulação de ações de combate ao mosquito vetor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram testadas 83 amostras de pacientes com diagnóstico presuntivo de infecção por chikungunya pelo método de qRT-PCR, das quais 31 confirmaram a presença do CHIKV;
- O estudo realizou sequenciamento de um fragmento de 434pb da região nsP1 do genoma viral para 03 amostras amplificadas pelo método de RT-PCR convencional;
- As três amostras isoladas no estudo apresentaram identidade elevada entre si e alto grau de similaridade com outras representantes do genótipo Asiático a nível mundial e com as cepas isoladas em outros estados brasileiros;
- A partir das 03 cepas de CHIKV isoladas, este estudo confirmou a presença do genótipo Asiático circulando no Estado; pois as cepas estudadas juntamente com outras cepas de Roraima se agruparam em um único subclado onde encontram-se representantes Asiáticas que formam a linhagem americana, sugerindo uma possível relação genética entre elas, sendo confirmada ainda pela relação de similaridade de 99,4 - 100% entre as mesmas.
- As cepas isoladas em Roraima, mostraram alto grau de conservação de substituição de nucleotídeos, equivalente com outros estudos que mostram que a proteína nsP1 é uma região altamente conservada. Apenas uma amostra apresentou substituição de nucleotídeos que resultou em 03 trocas de aminoácidos por transição e 01 troca de aminoácidos por transversão sendo Treonina por Serina (T118S) dos quais são bioquimicamente semelhantes;
- Não foi possível estimar com precisão a rota de introdução do CHIKV no Estado, todavia, os dados sugerem uma possível entrada a partir da Venezuela, dado a similaridade entre os casos importados desse país isolados em Roraima em 2014 e os casos autóctones deste estudo;
- As características clínicas apresentados pela infecção por chikungunya no estudo demonstraram a prevalência de sinais clássicos relatados em literatura como febre, cefaléia, artralgia e mialgia. A artralgia foi localizada principalmente nas articulações dos membros superiores e inferiores com duração de 3-10 dias. Houve relato de 33.3% de recorrência de dor articular após cerca de 45 dias da fase aguda e 33,3% de pacientes que relataram perceber após 03 meses outros sintomas não apresentados na fase aguda da doença;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, P. O. A. et al. Dengue in the northernmost part of Brazil from 1999 to 2011: characterization of circulating DENV strains. **Dengue bulletin**. V.36, p.50-63, dec, 2012.

ACOSTA, P. O. A. et al. Chikungunya vírus genotype circulating in Roraima, Brazil. In: CONGRESSO MUNDIAL DE EDUCAÇÃO E SAÚDE INFANTO-JUVENIL, 2, 2015, Boa Vista. **Atención primaria**, Barcelona: Elsevier, v. 47 (Espec cong 1), p. 3, abr. 2015. p. 3.

ALBUQUERQUE, I. G. C. et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** V.45, n. 1, p.128-129, Jan-Fev 2012.

AGARWAL, A. et al. Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in Aedes aegypti.**PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.8, n.7, p.1-6, Jul 2014.

ALENCAR, C. H.M. et al. Potencialidades do Aedes albopictus como vetor de arboviroses no Brasil: um desafio para a atenção primária.**Rev. APS**, v. 11, n. 4, p. 459-467, out/dez. 2008.

ARANKALLE, V. A, et al. Genetic divergence of chikungunya viroses in índia (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology.** v. 2007, n. 88, p. 1967-1976, march 2007.

BARRETO, M. L; TEXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**. V.22,n.64, p. 53-72, 2008.

BEESOON, S. et al. Chikungunya fever mauritius, 2006. *Emerging Infectous Diseases*. V.14, n.2, p. 337-338, feb 2008.

BORGHERINI, G. et al. Outbreak of chikungunya on reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical infectious diseases**. v. 44, p.1401-7, jun 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. **Plano de contigência para a introdução do vírus chikungunya**. Brasilia, 2014a, 35 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Preparação e Resposta à introdução do vírus chikungunya**. Brasilia, 2014b, 100p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. V. 47, n. 5, 2016, 8p.

BRASIL. Ministério do planejamento, orçamento e gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Diretoria de geociências. Coordenação de recursos naturais e estudos ambientais. **Uso da terra e a gestão do território no estado de Roraima**. Relatório técnico. Rio de janeiro, 2009.

BRASIL. InstitutoBrasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico – 2010**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 24 Nov. 2014.

BROOKS, E. M.; SHEFLIN, L. G.; SPAULDING, S. W. Secondary strucure in the 3’ UTR of EGF and the choice of reverse transcriptase affect the detection of message diversity by RT-PCR. **Biotechniques.** v.19. n.5. p.806-12, 1995.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real – time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of molecular endocrinology. v. 25, p.169-193, 2000.

CAGLIOTI, C. et al. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiologica**.v.36, p. 211-227, 2013.

CARVALHO, C.V; RICCI, G; AFFONSO, REGINA. Guia de Práticas em biologia molecular; editora Yendis; são caetano do Sul; 2010. Paginas 271 (35-36)-

CASSADOU, S. et al. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Euro Surveill**.V.19, n.13. p.20752, apr 2014.

CATÃO, R. C. **Dengue no brasil: abordagem geográfica na escala na nacional**. 2011. 160p. Dissertação (mestrado em geografia)- Faculdade de Ciência e Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Geografia. Presidente Prudente, 2011.

CENTRO DE GENOMAS. **Carta molecular: o centro de genomas compartilhando informaçoes n° 18.** Disponível em: < http://www.centrodegenomas.com.br/Arquivos/1/carta_molecular_N18.pdf> acesso em: 27 Maio 2016.

CENTER FOR DESEASE CONTROL AND PREVENTION. Department of health and human services. **CDC public healh grand rounds.** May 19, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/cdcgrandrounds/pdf/archives/2015/may2015.pdf> acesso em: 25 abril 2015.

COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A. B.; WEAVER, S. C. Chikungunya vírus- vector interactions. **Viruses.** v. 6, p. 4628-63, november 2014.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil** [online]. 1 ed. Rio de Janeiro: Ed.Fiocruz, 1994. 228p. disponível em: <http://books.scielo.org> acesso em: 22 nov 2014.

CORRÊA, M.; POSSIK, P. B. **A análise molecular por eletroforese- Biologia molecular- técnicas moleculares**: AC&T, 2016. Disponível em: <http://www.ciencianews.com.br/index.php/ciencia/biologia-molecular/biologia-molecular-tecnicas-moleculares/> acesso em: 12 mar. 2016.

DASH, P. K. et al. East Central South African Genotype as the CausativeAgent in Reemergence of Chikungunya Outbreak in India.**Vector- Borne and Zoobotic Diseases**. v.7, n.4, p.519-529, 2007.

E- ESCOLA**. Fundamentos da técnica de PCR**. Disponível em: < http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?hid=339 > acesso em: 13 mar 2016.

ENCONTRO DO PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14, 2014- 2015, Boa vista. **Caracterização molecular do vírus chikungunya isolados de soro de pacientes com síndrome febril no estado de Roraima no ano de 2014-2015 (anais ISSN 1677-8030**). Em fase de edição.

FARHAT, C. K; CARVALHO, L. H. F. R; SUCCI, R. C. M. **Infectologia Pediatrica**. 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 2007, 1.136 p.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative rt-pcr: pitfalls and potential. **Bio techniques**. v26. n.1 p. 112-125. Jan 1999.

FIGUEIREDO, L. T. M. Arbovírus emergentes no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Bras. Med. Med. Trop.Trop.** Uberaba, v.40 n.2 Uberaba mar./abr. v.40, n.2, p.224-229, março / abr. 2007 2007.

FOLHA WEB. **Primeiro caso de chikungunya transmitido em roraima é confirmado.** Boa vista, 22 Jan, 2015**.** Disponível em: <http://folhabv.com.br/noticia/Primeiro-caso-de-chikungunya-transmitido-em-Roraima-e-confirmado/3999> acesso em: 29 abr 2016.

GARCÍA MD, E. M. L. et al. Dengue y chikungunya: características clínica y laboratório en un área rural de la província del guayas, ecuador**. Liverpool School Tropical Medicine. 2015.** Disponível em: < http://www.academia.edu/12497500/Dengue_y_Chikungunya_Caracter%C3%ADsticas_Cl%C3%ADnicas_y_de_Laboratorio_en_un_%C3%81rea_Rural_de_la_Provincia_del_Guayas_Ecuador > acesso em: 02 jul 2016.

GUATELLI, J.C.; GINGERAS, T. R.; RICHMAN, D. D. Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency vírus type 1 infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 2. n.2, p217-226. apr 1989.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.**ClinMicrobiol Rev**. v.11, n.3, p. 480-496, July 1998.

HEID, C. A, et al. Real time quantitative pcr. **Genome research**. V.6, p. 986-994, 1996.

HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. Frequencia de larvas e pupas de Aedes aegypty e Aedes albopictus em armadilhas, Brasil. **Rev saúde pública**. V.35, n.4, p.385-391. Abril 2001.

IGARASHI, B. Isolation of a Singh's Aedes albopictus Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses.**J. genVirol**, (1978), n. 40, p.531-544, Mar 1978.

JAIANAND, K; RAMESH, M.; GUNASEKARAN, P.; SHERIFF, A.K.Mocelular detection of chikungunya virus targenting the immunodominant envelope (E1) gene: current status and future applications. **Molecular Biology.** V. 1, n. 4, p.282-293, Oct- Dec 2010.

KEARSE, M. et al. KEARSE, M. et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, 2012.

KHAN, A. H. et al.Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journalof general virology**. v.83, n. 2002, p.3075-3084, 2002.

KIDD,I. M.; CLARK, D. A.; EMERY, V.C.A non- radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpesvirus 7 load. J**. Virol. Methods**. v.87, p.177-181,2000.

KRISHNA, M. R.; REDDY, M. K.; REDDY, S. R. Chikungunya outbreaks in Andhra Pradesh, South India.**CurrentScience**.v.91, n.5, p. 570-571, Sep. 2006.

KUBISTA et al. The real- time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine.** v. 27, n.2-3, p. 95-125, apr-jun 2006.

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C. FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. Rev med. n. 90, n. 1, p. 47-51. São Paulo, jan-mar 2011.

LANCIOTTI, R. S., et al., Emergence of Epidemic O'nyong-nyong Fever in Uganda after a 35-Year Absence: Genetic Characterization of the Virus. **Virology.** v. 252, p. 258-268, september 1998.

LANCIOTTI, R. S. et al., Chikungunya virus in US Travelers Returning from **Índia, 2006. Emerging Infectious Diseases**. v.13, n.5, p. 764- 767, maio 2007.

LEPARC-GOFFART, I. *et al*. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, fev. 2014.

LEROY, E. M. et al. Concurrent chikungunya and dengue vírus infections during simultaneous outbreaks, gabon, 2007. **Emerging Infectious Diseases**. v.15, n.4, p.591-593. Apr 2009.

LEUNG, J. Y; MAH-LEE NG, M; HANN CHU, J. J. Replication of alphaviruses: a review on the entry processo of alphaviruses into cells. **Advances in virology.** v. 2011, 9p. May 2011.

LEVI, J. E. Marcadores moleculares aplicados a organismos de interesse epidemiológico: curso PCR em tempo real. 17-22 ago de 2009. Notas de aula. Disponível em: <http://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/spp/2%20curso_mol/PCR_TEMPO_REAL.pdf> acesso em 12 mar 2016.

LIMA CAMARA, T. N.; HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. Frequência e distribuição espacial de aedesaegypty e Aedes albopictus (Diptera, Culididae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.22, n.10, p. 2070-2084, out 2006.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. NITSCHE, A. Survey and summary real- time pcr in virology. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305. Jan 2002.

MARTINS, M. DE S. N. **Diagnóstico molecular retrospectivo de febre catarral maligna em bovinos**. 2014. 104p. Dissertação (mestrado em sanidade, segurança alimentar e ambiental no agronegócio)- Instituto Biológico, Programa de Pós Graduação. São Paulo, 2014.

MENESES, C. A. R. **Identificação de arbovírus dengue, mayaro e oropouche em amostras com dengue negativo pela técnica ns1 no estado de Roraima, no ano de 2012**. 2013. 60p. Dissertação (mestrado em ciências da saúde)- Universidade Federal de Roraima, Boa Vista RR, 2013.

MOREIRA, J. M. **Tamanho ótimo de amostra biológica para estudo na pcr em tempo real**. 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação agropecuária)- Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, 2012.

MULLIS et al. Especific enzimatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **CSH Symposia**. v.51, p. 263-273. 1986.

MULLIS, et al. Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a termoestable DNA polymerase. **Science reporter**, v. 239. n. 4839, p.487-491. jan 1988.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific american**, v. 262, p. 56-65, apr 1990.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de pcr e rt- pcr em tempo real e suas aplicações na área médica**. RBM**. v. 67, p. 7-19, nov 2010.

NIYAS, K. P. et al. Molecular characterization of chikungunya vírus isolates from clinical samples and adult aedes albopictus mosquitões emerged from larvae from kerala, South índia. **Virology Journal**. v. 7, p. 189. August 2010.

NG, L. C.; HAPUARACHCHI, H. C. Tracing the path of chikungunya vírus- evolution and adaptation. **Infection Genetics and Evolution,** v. 10, p. 876-885, July 2010.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real- uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Rev biotecnol cienc & desenv**. ed.33, p. 10-13 jul/ dez 2004.

OKINO, C. H. **Desenvolvimento da técnica de RT-PCR em tempo real para a detecção e diferenciação de estirpes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas**. 2007. 104p. Dissertação (mestrado em medicina veterinária). Universidade estadual paulista, Faculdades de ciências agrárias e veterinária, Jaboticabal, 2007.

OLIVEIRA et al. Fundamentos teórico- práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase [recurso eletrônico]. EMBRAPA Pecuária sudeste. São carlos, 2007. < http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf> acesso em: 03 mar 2016.

OLIVEIRA, M.S. Enagis-May: **uma proposta de ensaio de aglutinação indireta para detectar no sangue imunoglobulinas contra o vírus marayo**. 80p. Dissertação (magister scientiae)- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

OSANAI, C. H. Surto de dengue em boa vista, Roraima, nota prévia. **Rev. Inst. Med. Trop**. v.25, n.1, p. 53-54, Jan-Fev, 1983.

PADBIDRI, V. S; GNANESWEAR, T. T. Epidemiological investigqations of chikungunya epidemic at barsi, maharashtra state, índia. **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.** V.23, n.4, p.445-451, 1979.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del vírus chikungunya em las Américas. **Biblioteca sede OPS**. Washington, 2011. Disponível em: < http://www.paho.org/hq/> acesso em: 17 nov 2014.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization. **Actualización Epidemiológica Fiebre por chikungunya 23 de mayo de 2014**. Disponível em: <http://www.paho.org/chikungunya> acesso em: 17 nov 2014.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization. **CHIKV Surveillance in the americas: detection and laboratory diagnosis**. 2013. Disponível em: < http://www.paho.org/hq/> acesso em: 13 abril 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization. **Chikungunya: datos estadísticos; distribución geográfica**. Disponível em: <http://www.paho.org/viruschikungunya>, acesso em: 07 abril 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization. **Informe sobre la transmissión del vírus del chikungunya y su repercusión em la región de las américas**. Washington,2015. Disponível em: < www.paho.org/hq/index.php?option=com...task.> acesso em: 14 abril 2016.

PAQUET, C. et al. Chikungunya outbreak in Réunion: epidemiology and surveillance, 2005 to early january 2006.**Euro surveill.** V. 11, n. 5, p. 2891, Feb 2006.

PEREIRA, F. ; MACIEL, M. **PCR Quantitativo em tempo real**: Publicações Weinmann – Biologia Molecular, 2004. Disponível em:< http://www.publicacoesweinmann.com.br/2009/04/pcr-quantitativo-em-tempo-real.html > acesso em: 12 Mar. 2016.

PFEFFER, M. et al. Genus specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription polymerase chain reaction.Am. J. Trop. Med. Hyg. V.57, n.6, p.709-717, 1997.

PORTAL DA SAUDE. Ministério da saúde. **Chikungunya: Situação atualizada.** Disponível em **<**www. saude.gov.br acesso> em: 18 nov 2014.

PORTAL DA SAUDE. Ministério da saúde. **Prevenção e combate, dengue, chikungunya e zika: Saiba reconhecer os sintomas**. Disponível em: <http://combateaedes.saude.gov.br/sintomas> acesso em: 12 de abril 2016.

PORTAL DE SAUDE. Secretaria de estado da saúde de Roraima. **Dengue e chikungunya- casos no país vizinho mobilizam coordenações em Roraima**. Disponível em: <http://www.saude.rr.gov.br/index.php/servicos-e-informacoes/noticias/noticias-outubro-2013/776-dengue-e-chikungunya-casos-no-pais-vizinho-mobilizam-coordenacoes-em-roraima> acesso em: 25 nov 2014.

PORTAL DE SAUDE. Secretaria de estado da saúde de Roraima. Sobre chikungunya, notificação de casos no Brasil. Disponível em: <http://www.saude.rr.gov.br/images/saude/apps_saude/manual_chikungunya/www/main.html#page5> acesso em: 11 abril 2016.

PORTAL G1. **Sesau confirma primeiro caso de febre chikungunya em Roraima**. Disponível em: <http://g1.globo.com/rr/roraima/noticia/2014/09/sesau-confirma-primeiro-caso-de-febre-chikungunya-em-roraima.html> acesso em: 29 de abr 2016.

POWERS, A. M. et al. Re- emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships**. J. Virol.** v.81, p. 471-479, octuber 2000.

POWERS, A. M. et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses.**J. Virol**. v.75, n.21, p.10118-10131, Nov 2001.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya vírus in italy: in outbreak in a temperate region. **Lancet**, v.370, n.1, p.1840-1846. Dec 2007.

ROBINSON, M, C. Na epidemic of vírus disease in Southern province, tanganyika territory, in 1952-53, clinical features.**Trans R Soc Trop Med Hyq.** v.49, n. 1, jan 1955.

ROHANI, A. et al. Rapid detection of chikungunya virus in laboratory infected Aedesaegypti by Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Tropical biomedicine**. v.22, n.2, p. 149-154, 2005.

ROSS, R. W. The newala Epidemic, III the vírus: isolation, pathogenic, properties and relationship to the epidemic. **J Hyg (lond)**, v.54, n. 2, p. 177-191, jun 1956.

ROSSETTI, V. **Aedes aegypti- a epidemiologia do chikungunya**. Portal netnature, 2016. Disponível em: < https://netnature.wordpress.com> acesso em 14 abril 2016.

SAHADEO, N. Et al. Molecular characterisation of chikungunya vírus infections in trinidad and comparison of clinical and laboratory features with dengue and other acute febrile cases. **Plos Neglected Tropical Deseases**. V.9, n.11, p.4199, nov. 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natil. Acad. Sci. USA**, v.74, n.12, p.5463-5467, dez. 1977.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenação de controle de doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Informe Técnico**. Chikungunya, julho 2014.São Paulo, junho 2014. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/informes/IFOUT14_CHIKUNGUNYA.pdf> acesso em: 18 nov 20014.

SANTOSH, S. R. Appearance of EI: A226V mutant Chikungunya virus in Coastal Karnataka, India during 2008 outbreak. **VirologyJournal**. V.6, n. 172, p.1-6, 2009.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak.**PLoS Medicine.** V.3, n.7, p.1058-1069, jul 2006.

SCIENCE IS ART. **A (short) history of pcr, 2008.** Disponível em: <http://www.scienceisart.com/A_PCR/PCRhistory_2.html> acesso em: 29 fev 2016.

SEIJO, A. et al. Tenosinovitis por vírus chikungunya. **Medicina.** V.74, n.6, p.476-478. Nov 2014.

SHAN, K. V; GIBBS C.J. JR; NANERGEE, G. Virological investigation of the epidemic of three strains of chikungunya vírus. **Indian J Med Res**. v.52. p.676-683. Jul 1964.

SOLIGNAT et al., Replication of chikungunya: a reemerging arbovirus. **Virology.** v. 393, n. 2, p. 183-197. Octuber 2009.

SOUMAHORO, M. K. et al. Impacto f chikungunya vírus infection on health status and quality of life: a retrospective cohort study. **Plos one**. V. 4, n.11, nov 2009.

STAPLEFORD, K. A. et al. Whole-genome sequencing analysis from the chikungunya vírus caribbean outbreak. **Plos Neglected Tropical Diseases.** v.10, n.11, january 2016.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The Alphaviruses: Gene Expression,Replication, and Evolution. **Microbiol Rev**. v.58, n.3, p.491-562, sept 1994.

TAUIL, P. L. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiol. Serv. Saúde**. Brasília, v. 23, n. 4, p. 773-774, Out/ Dez. 2014.

TAMURA, K. *et al*. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular BiologyandEvolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**. V.8, n.4, p. 5-33, out/dez 1999.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 964 p.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Arboviroses. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: Ed. Cejup, 1997. 886p.

TSETSARKIN, K. A.; WEAVER, S. C. Sequential adaptive mutations enhance eficiente vector switching by chhikungunya vírus and its epidemic emergence. **Plos Pathog.** v. 7, n. 12, p. 1-15 , December 2011.

VASCONCELOS, P. F. C. Emergência do *vírus Chikungunya*: risco de introdução no Brasil. **RevPan-AmazSaude**. Ananindeua, v.5, n.3, p., Sept. 2014.

VAZEILLE, M.; MOUSSON, L.; FAILLOUX, A.Failure to demonstrate experimental vertical transmission of theepidemic strain of Chikungunya virus in Aedes albopictus from La Réunion Island, Indian Ocean. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro.v.104, n.4, P.632-635, jul 2009.

VIEIRA, F. R. **Cadernos de Saúde**. V.3, n. especial infecção associada a práticas de saúde, p.47-52, 2010.

VIRAL ZONE; Alfavírus. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html acesso em: 23 abril 2016

VOLK, S. M. et al. Genome- scale phylogenetic analyses of chikungunya vírus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of virology.** v.84, n.13, p.6497-6504. July 2010.

WHO MEDIA CENTRE. **Chikungunya**. Fact sheet n.37 updated October 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/> acesso em: 24 nov 2014.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real- time pcr for mRNA quantitation. **Bio techniques.** V. 39, n.1, p. 75-85, jul 2005.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA - UFRR

Continuação do Parecer: 409.084

NÚMERO DE PROTOCOLO INTERNO, ANTES DA OBTENÇÃO DAS CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA OPERAÇÃO NA PLATAFORMA BRASIL. PORTANTO, O REFERIDO PROJETO FOI APRECIADO E APROVADO EM REUNIÃO DO CEP NA DATA DE 07/12/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O PROJETO DE PESQUISA EM QUESTÃO FOI APRESENTADO AO CEP EM FORMATO FÍSICO SOB O NÚMERO DE PROTOCOLO INTERNO, ANTES DA OBTENÇÃO DAS CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA OPERAÇÃO NA PLATAFORMA BRASIL. PORTANTO, O REFERIDO PROJETO FOI APRECIADO E APROVADO EM REUNIÃO DO CEP NA DATA DE 07/12/2012.

Recomendações:

O PROJETO DE PESQUISA EM QUESTÃO FOI APRESENTADO AO CEP EM FORMATO FÍSICO SOB O NÚMERO DE PROTOCOLO INTERNO, ANTES DA OBTENÇÃO DAS CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA OPERAÇÃO NA PLATAFORMA BRASIL. PORTANTO, O REFERIDO PROJETO FOI APRECIADO E APROVADO EM REUNIÃO DO CEP NA DATA DE 07/12/2012.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROJETO DE PESQUISA EM QUESTÃO FOI APRESENTADO AO CEP EM FORMATO FÍSICO SOB O NÚMERO DE PROTOCOLO INTERNO, ANTES DA OBTENÇÃO DAS CONDIÇÕES NECESSÁRIAS PARA OPERAÇÃO NA PLATAFORMA BRASIL. PORTANTO, O REFERIDO PROJETO FOI APRECIADO E APROVADO EM REUNIÃO DO CEP NA DATA DE 07/12/2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BOA VISTA, 27 de Setembro de 2013

Assinador por:
Ijanílio Gabriel de Araújo
(Coordenador)

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº2413
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.304-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@prpppg.ufrr.br

ANEXO B

Protocolo de purificação do produto de PCR pela precipitação com Polietilenoglicol-PEG

Precipitação de produto da PCR com Polietilenoglicol (PEG)

A precipitação com Polietilenoglicol (PEG) atua como método de purificação da PCR com objetivo de remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento. Apresenta um bom rendimento, podendo utilizar somente 0,5-1µL da amostra na reação de seqüenciamento. O método não é recomendado para PCR com bandas inespecíficas ou com primer dimers.

Antes de iniciar o procedimento:

A- Armazene o etanol 80% a -20°C;

B- Programe o banho-maria ou banho seco a 37°C.

Procedimento:

1- Transfira o volume da PCR para tubo de 1,5mL e adicione PEG (20%);

Obs: o volume de PEG a ser adicionado deve ser igual ao volume da PCR.

2- Agite suavemente em vórtex por 10 segundos e incube a 37°C por 15 minutos;

3- Após incubação, centrifugue a 6000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente;

4- Descarte o sobrenadante e adicione 125µL de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 4500 rpm por 2 minutos;

5- Descarte o sobrenadante e deixe secando a 37°C por 15 minutos para remoção de resíduos de etanol;

6- Certifique a ausência de resíduos de etanol e adicione água livre de nuclease, sendo adicionado o mesmo volume inicial da PCR.

7- Agite em vórtex por 10 segundos e armazene amostra a -20°C

Obs: antes de armazenamento da amostra a -20°C armazene a 4-5°C por algumas horas para uma melhor eluição do DNA.

Solução PEG (20% w/v PEG, 2,5M NaCl)

10g de Polietilenoglicol 8000

7,3g de NaCl

Adicione 35 mL de ddH_2O

Agite para solubilizar o PEG durante 20 minutos, ou até o mesmo encontre-se solúvel. Após, complete o volume para 50 mL com ddH_2O.

ANEXO C

Protocolo de purificação da reação de sequenciamento

PROTOCOLO EtOH/EDTA/ACETATO DE SÓDIO. – BULA BIGDYE V3.1 APPLIED BIOSYSTEM

Para precipitar reações de 10uL em placas com 96 poços:

1. Remova a placa do termociclador/congelador e centrifugue 1 min 2000 RCF;
2. Adicione quantidades iguais de EDTA 125mM e acetato de sódio 3M (pH 5,2) necessárias para a quantidade de poços utilizados na placa e pipete 2µL dessa solução em cada poço;

Nota: tenha certeza que esta solução foi adicionado no fundo dos poços.

3. Adicionar 25µL de EtOH 100% gelado, a cada um dos poços;
4. Sele a placa com *strips* e misture por inversão (4x);
5. Incube por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz;
6. Centrifugue a 2.000 RCF por 45 minutos;

Importante: o próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível, então faça um spin na placa por mais 2 minutos antes de recomeçar

7. Inverta a placa e faça um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Obs: Antes de inverter a placa, desprezei o conteúdo da mesma na pia junto com uma leve batida na mesa. Após esta centrifugação, programá-la para a temperatura de 4°C

8. Adicione 35µL de EtOH a 70% em cada um dos poços;
9. Centrifugue por 15 minutos, à 4°C e 1.650 RCF;

Obs: Caso tenha esquecido a programação para 4°C, acione o FAST temperatura

10. Inverta a placa e faça um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Nota: comece a contar o tempo assim que o rotor começar a se mover.

11. Incube a placa à 52°C por 15 minutos, cobrir com papel alumínio (termociclador)
12. Se não for colocar no sequenciador imediatamente, congelar a placa seca ao abrigo da luz;
13. No momento de sequenciar ressuspender com 10 uL de formamida Hi-Di, levando a placa ao agitador de placa seguido de um spin;
14. Aqueça a placa 95°C por 1 minuto, monte e coloque no sequenciador.[1]

[1] *Versão 1.2 de 07/03/2013*

ANEXO D

Questionário de avaliação da sintomatologia de chikungunya

Questionário de Avaliação Clínica de Infecção por Chikungunya em Roraima

Dados do entrevistado:

NOME: ____

ENDEREÇO: ______________________, Nº_____, ______________

CIDADE: __________ UF: _____ FONE: __________ IDADE:__________

1) Qual fator (sintomas) fundamental que o fez procurar a unidade de saúde?

( ) Febre ( ) Calafrio ( ) Dor articular ( ) Cefaléia ( ) Dor nas costas ( ) Náusea

( ) Vômito ( ) Mialgia ( ) Sangramento ( ) Exantema (manchas avermelhadas na pele)
( ) Conjutivite ( ) Edema ( ) Outros sintomas. Cite quais: __________
____

2) No caso de ter ocorrido dor nas articulações (artralgia), cite em quais membros:

( ) dedos das mãos ( ) dedos dos pés ( ) Punhos ( ) tornozelos ( ) cotovelos

3) Fez uso de algum medicamento ou tratamento específico para artralgia?

( ) não fez ( ) usou medicamentos ( ) outros: __________

4) A dor articular o impediu de executar tarefas cotidianas?

( ) não ( ) Sim

5) Qual o tempo de duração da dor articular

( ) 03 a 10 dias ( ) 15 dias a 01 mês 02 meses ( ) 03 meses ( ) mais de 03 meses:
____

6) Após tratamento, as dores articulares voltaram a ocorrer? Caso seja sim, cite quanto tempo após tratamento a dor retornou:

( ) não ( ) Sim após: ______________________________________

7) Após 03 meses do tratamento inicial, ocorreu ou ocorre outros sintomas além da artralgia?

( ) não ocorreu ( ) Artrite ( ) Artralgia ( ) dor nos ossos ( ) Cansaço ( ) Fraqueza ( ) depressão ( ) Outros: ______________________

8) Nos últimos 30 dias anterior ao início dos sintomas viajou para país ou Estado com caso suspeito ou confirmado de chikungunya? Se sim, cite o local

( ) não viajou ( ) Sim Local: ______________________________

ANEXO E

Confirmação de submissão de depósito das sequências no GenBank

Dear GenBank Submitter:

Thank you for your direct submission of sequence data to GenBank. We have provided GenBank accession numbers for your nucleotide sequences:

BankIt1928321 Chikungunya_virus_strain_14/106RR_partial_nsP1 KX394251
BankIt1928321 Chikungunya_virus_strain_14/113RR_partial_nsP1 KX394252
BankIt1928321 Chikungunya_virus_strain_15/18RR_partial_nsP1 KX394253
BankIt1928321 Chikungunya_virus_strain_15/113RR_partial_nsP1 KX394254
BankIt1928321 Chikungunya_virus_strain_15/116RR_partial_nsP1 KX394255

The GenBank accession numbers should appear in any publication that reports or discusses these data, as it gives the community a unique label with which they may retrieve your data from our on-line servers. You may prepare and submit your manuscript before your accessions are released in GenBank.

Submissions are not automatically deposited into GenBank after being accessioned. Each sequence record is individually examined and processed by the GenBank annotation staff to ensure that it is free of errors or problems.

You have not requested a specific release date for your sequence data. Therefore, your record(s) will be released to the public database once they are processed. If this is not what you intended, please contact us as soon as possible with the correct release date.

Since the flatfile record is a display format only and is not an editable format of the data, do not make changes directly to a flatfile. For complete information about different methods to update a sequence record,

see: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html

Any inquiries about your submission should be sent to gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov

For more information about the submission process or the available
submission tools, please contact GenBank User Support at
info@ncbi.nlm.nih.gov.

Please reply using the original subject line.
This will allow for faster processing of your correspondence.

Sincerely,

Lori Black, PhD

The GenBank Direct Submission Staff
Bethesda, Maryland USA
****
info@ncbi.nlm.nih.gov (for general questions regarding GenBank)
www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK51157/ GenBank Submissions Handbook

ANEXO F

Sequências das cepas de CHIKV extraídas do GenBank

Número de acesso	País	Ano de Isolamento	Genótipo
KR559479	REPÚBLICA DOMINICANA	2014	Asiático
KR559489	JAMAICA	2014	Asiático
KT327163	MÉXICO	2014	Asiático
CNR20235	SÃO MARTIM	2013	Asiático
LN89093	MARTINICA	2013	Asiático
KR559496	GUIANA	2014	Asiático
KR559491	COLÔMBIA	2014	Asiático
KJ689452	MICRONÉSIA	2013	Asiático
KP164572	BRASIL	2014	Asiático
KP164571	BRASIL	2014	Asiático
KJ451624	ILHAS VIRGENS BRITÂNICAS	2014	Asiático
KR046229	TRINIDAD	2014	Asiático
KP164567	BRASIL	2014	Asiático
FJ807897	INDONÉSIA	2007	Asiático
EU703759	MALÁSIA	2006	Asiático
EU703760	MALÁSIA	2006	Asiático
FN295484	MALÁSIA	2006	Asiático
HE806461	NOVA CALEDÔNIA	2011	Asiático
HM045790	PHILIPINAS	1985	Asiático
HM045791	INDONÉSIA	1983	Asiático
HM045789	TAILÂNDIA	1988	Asiático
HM045787	TAILÂNDIA	1995	Asiático
HM045788	INDIA	1973	Asiático
AF027141	INDIA	1973	Asiático
EFO27140	INDIA	1963	Asiático
KX394251	BRASIL/RR	2014	Asiático
KX394252	BRASIL/RR	2014	Asiático
KP003810	ITÁLIA	2007	IOL
KT336781	INDIA	2013	IOL
GU199350	CHINA	2008	IOL
KJ796844	INDIA	2009	IOL
KJ796846	INDIA	2009	IOL
FN295487	MALÁSIA	2008	IOL
KF590564	MYANMA	2010	IOL
KT449801	LIBÉRIA	2006	IOL

DQ443544	LIBÉRIA	2006	IOL
FR717336	ILHA REUNIÃO	2005	ECSA
FR717337	ILHA REUNIÃO	2005	ECSA
KP164569	BRASIL	2014	ECSA
KP164570	BRASIL	2014	ECSA
KP164568	BRASIL	2014	ECSA
HM045784	REP. CENTRO AFRICANA	1984	ECSA
AF369024	TANZÂNIA	1953	ECSA
KJ679577	INDIA	2011	ECSA
HM045811	TANZÂNIA	1953	ECSA
HM045792	ÁFRICA DO SUL	1956	ECSA
KP003813	CONGO	2011	ECSA
KP003812	GABÃO	2007	ECSA
HM045786	NIGÉRIA	1964	WE
HM045807	NIGÉRIA	1965	WE
HM045785	SENEGAL	1966	WE
HM045798	SENEGAL	1966	WE
HM045820	COSTA DO MARFIM	1993	WE
HM045815	SENEGAL	2005	WE
HM045817	SENEGAL	2005	WE
HM045818	CHILE	1981	WE
HM045816	SENEGAL	1966	WE
HM045819	SENEGAL	1993	WE

AURENICE DOS REIS ROCHA RODRIGUES - Possui graduação em Farmácia com Habilitação em Análises Clínicas e Toxicológicas - Pós- Graduação em Farmacologia Clinica . Mestre em Ciências da saúde (Universidade Federal de Roraima). Farmacêutica na coordenação de vigilância em Saúde com atuação na área do Programa de Controle da Malária e gestão de insumos estratégicos.